



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

ONCOGENES:
REVISION BIBLIOGRAFICA

T E S I S

Que para obtener el Título de:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P r e s e n t a:

Sandra Delgado Solís

Director de Tesis Dr. Ricardo V. Santiago Díaz

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuautitlán Izcalli, Estado de México
Marzo, 1988



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

CAP.		Pag.
I	<u>INTRODUCCION</u>	
1.	Origen del estudio del cáncer	1
2.	Objetivos	6
II	<u>GENERALIDADES SOBRE ONCOGENES</u>	
1.	Conceptos básicos sobre oncogenes	7
2.	Teorías acerca del origen de los oncogenes	8
3.	Clasificación	10
4.	Oncogenes virales	13
5.	Oncogenes celulares	18
6.	Mecanismos de activación oncogena	20
	a. Cinasas	21
	b. Factores de crecimiento	24
	c. Amplificación	31
	d. Otros mecanismos	32
7.	Características de los oncogenes más estudiados	36
	a. Oncogenes virales	36
	b. Oncogenes celulares	41
III	<u>TECNICAS</u>	
1.	Técnicas de estudio de los oncogenes	52
2.	Técnicas de diagnóstico en laboratorio	54
IV	<u>EPILOGO</u>	
1.	Comentarios al presente trabajo	57
2.	Conclusiones	57
V	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	59

CAPITULO I. INTRODUCCION

1. Origen del estudio del cáncer.

El cáncer fue conocido desde la antigüedad, ya que en los primeros escritos de griegos y romanos hacen referencia a él. (20)

El hallazgo de huesos en sepulcros, alrededor de unos 5000 años atrás (2700 AC) en Necrópolis, ciudad egipcia cerca de Gizeh, muestran momias con las primeras neoformaciones malignas humanas; así mismo en las primeras escrituras de India, Egipto, China se hallan señalamientos sobre tumores malignos, y el hallazgo de tumores en huesos de dinosaurios y otros animales prehistóricos indican que la humanidad ha estado en contacto con enfermedades de tipo oncológico desde sus comienzos. (66)

El desarrollo de la oncología antigua tuvo como mayor aporte los trabajos de representantes de la medicina clásica antigua: a Hipócrates y Avicena (Abu Alí Ibn-sina). A Hipócrates se le conoce como el autor de las nociones "cancer", "sarcoma" y "carcinoma". Al observar la semejanza de algunos tumores con la carne de pescado Hipócrates propuso denominarlos tumores carnosos o sarcomas (sarx sarcos: carne), A los tumores que por su distribución recordaban los despliegues de las patas de langosta, sugirió llamarlos cancerosos (Karkinos: cangrejo): atribuyéndole la causa de este padecimiento a un exceso de bilis negra. Avicena por su parte escribió que el tumor debe extirparse saliendo de sus bordes y después quemar el fondo de la herida con un hierro candente, lo cual ha somerado a los médicos modernos por su exactitud. (66, 89)

Referencias del cáncer se pueden encontrar en numerosos tratados de Medicina antigua tanto de culturas orientales y del Este, -

ganio lugar a pioneros en el estudio de éste, tales como Celso, Galeno, Falopio, Ambroise Paré, Tulpius Morgagni junto a los ya mencionados Hipócrates y Avicena. (66)

Las primeras descripciones de las enfermedades tumorales y los intentos de explicar su causa, aparecen en crónicas antiguas como "carne mala" o "salvaje" a las ulceraciones características de algunos cánceres. El término "cáncer" aparece en el siglo XVIII y sólo se relaciona los tumores de los tegumentos externos, sin indicación a los tumores de las vísceras, apareciendo más tarde las referencias acerca de su desintegración y metástasis. En el libro "Lección de cómo se denomina médicamente cada enfermedad", se describe: "El cáncer es una pupa podrida, que anda por el cuerpo, pasa de un lado para otro, tiene malos olores y es muy maligna". (66)

En el siglo XVIII en el "Manual de la ciencia médica" aparecen los primeros intentos de explicar la causa del desarrollo de esta enfermedad: "en la mayor parte de los casos, el cáncer sucede en los nódulos cuando el tumor endurecido comienza a doler y se convierte en úlcera maligna, sus causas lejanas son: la irritación externa de esos ensuciamientos por medicinas fuertes, y compresión y resentimiento prolongados y grandes del alma". Para el tratamiento de este mal se recomendaban el uso de distintas hierbas y raíces; y su profilaxis indicaba "cuidarse de no irritar el cáncer oculto con la aplicación de sustancias externas fuertes, pegajosas y viscosas y no irritar con el rozamiento, ya que es el mejor medio preventivo, así como el contacto con todo lo caliente, condimentado y picante en las comidas y en las bebidas, el aire caliente, las intranquilidades del alma, el movimiento corporal fuerte y las constipaciones. Aparece en 1739 en el tratado curativo datos referentes a la cura del cáncer mediante cirugía " la curación actual se efectúa con la prematura excisión del cáncer, pero cuando él está arraizado o cuando aparece por causas internas, cuando los jugos se han estropeado, el paciente

es débil y no muy joven, cuando el cáncer no está en lugar justo - de tal forma que no puede ser extirpado hasta su base, entonces - esta operación pocas veces, y en último caso nunca tiene el efecto deseado.

En el año de 1911 Peyton Rous descubre que mediante la inoculación de un filtrado libre de células procedentes de un tumor de pollo se puede obtener tumores similares en otros pollos carentes de estos en poco tiempo, declarando que en este filtrado va el - agente causal de estos, que tiempo más tarde se descubre que es un virus. (6, 46, 49)

En 1970 T.H. Temin y D. Baltimore extienden el concepto de virus cancerígenos a los virus cuyo material genético es RNA por el descubrimiento de la transcriptasa inversa, enzima que es capaz de transformar el genoma de estos virus a DNA viral y provocar que los genes de este virus se comporten como celulares y se lleve a cabo - la infección y la transformación de las células. (25)

Para 1978 H. Wolfe demuestra que en tumores de un mismo origen como los cánceres experimentales de hígado de rata, existe una - alteración en el orden de expresión de los genes, por lo que esta - se ve alterada y no es la misma en las diferentes regiones de un - mismo tumor. Este mismo año M.S. Collet y R.L. Erickson demuestran que la carcinogénesis requiere de la expresión de un gen particular como es el caso del "src" presente en el genoma del virus en el - sarcoma de Rous. (25)

De 1979 a 1981, los grupos de Bishop, De Woude y de Verma - concluyen que el gen vírico "src" no es otra cosa que un gen celular normal que ha sido capturado accidentalmente por un virus. (25)

En 1980 se publica que existe un gran parecido entre las es--
tructuras de los genes del cáncer encontradas en especies animales muy distintas entre si como el pollo, gato y el humano; lo que demuestra que han sido conservadas a lo largo de la evolución y que

es posible juegan un papel importante en las funciones biológicas de los seres vivos, de esto en 1982 se descubre que estos genes tienen un papel importante durante la embriogénesis. Y de esta forma día con día se hacen descubrimientos de mayor interés y que nos acerca más al conocimiento de las enfermedades oncológicas. (25)

Poetas y científicos han escrito a veces en forma mordaz en cuanto a esta enfermedad y dos ejemplos de esto son:

Kipling: "Cáncer, el cangrejo yace tan tranquilo que se podía creer que está dormido, si no fuera por el incesante juego y movimientos oscilatorios de las ramas pulmonares alrededor de su boca. Este movimiento nunca cesa, y es parecido al devorar de un fuego asfixiante en el interior de un madero podrido en el que avanza silencioso y sin prisa".

Devon Kous: "Los tumores destruyen al hombre en forma única en su género, que causa consternación como carne de su propia carne, la cual de algún modo o por alguna razón se ha convertido en proliferativa, desentrenada, agresiva, pedatoria e ingobernable. (89)

Como se ha descrito, las enfermedades oncológicas han sido y siguen siendo un problema mundial, los investigadores de todas las áreas han tratado de establecer un agente etiológico de dichos males encontrando que no es un sólo agente, sino que son varios y en algunos casos combinaciones de estos. En el siglo actual se ha hecho un descubrimiento de suma importancia, la presencia de genes involucrados con procesos oncológicos, además con el hallazgo de que son genes normales dentro del patrimonio genético humano, que tienen una función específica, y que sólo alterándola su expresión puede dar lugar a enfermedades oncológicas que existen y pertenecen a una familia que en recientes años se ha ido conociendo.

Lo anterior indica que así como tenemos genes que son los que se encargan de regir las funciones normales de un organismo, también pueden transformarlas a un estado anormal, lo que nos hace portado-

res potenciales de cualquier tipo de cáncer relacionado a dicha -
familia de genes.

2. Objetivos.

+ Realizar una revisión de tipo bibliográfico con material de fácil acceso por su costo y localización que conjunte aspectos bioquímicos y genéticos, dentro del estudio de la familia de los oncogenes descritos hasta el momento, con finalidad didáctica para los estudiantes de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo con orientación en genética.

+ Introducir al conocimiento de aquellos genes cuya expresión se traduce en enfermedades de tipo oncológico, sus niveles de acción y organismos que afecta; cual es su estructura y como ésta influye en la regulación metabólica de los seres afectados, así como los mecanismos que controlan o regulan la expresión normal de dichos genes.

+ Identificar mediante sus características ya descritas, a aquellas enfermedades que su etiología radica en la familia de los oncogenes, así como aquellos factores y agentes que son inductores de la activación de estos, provocando una respuesta patológica en el organismo involucrado.

+ Dar a conocer los estudios y las técnicas de laboratorio, que pueden ser usados rutinariamente en la clínica y en el campo de investigación como método de diagnóstico para la detección de las enfermedades asociadas a oncogenes.

CAPITULO II. GENERALIDADES SOBRE ONCOGENES

1. Conceptos básicos sobre oncogenes.

Para el mejor entendimiento del presente trabajo es necesario tener en cuenta dos conceptos muy importantes que se manejan a lo largo del texto y son :

Oncogenes: "a los genes involucrados en procesos cancerosos se les puede definir como versiones alteradas de genes normales (proto-oncogenes) los cuales codifican proteínas que desempeñan funciones importantes en la célula. A estos genes se les llamó oncogenes." (20, 21, 65, 85)

Protooncogenes: "Los oncogenes fueron inicialmente identificados como el principio transformante de penetración de los retrovirus transformantes. Subsecuentemente se encontró que eran versiones alteradas de genes normales celulares a los cuales se les designó como proto-oncogenes". (30, 47)

Para facilitar el estudio de los oncogenes, dentro de su nomenclatura se les denomina con tres letras, que derivan del virus en el cual se definieron primero, por ejemplo: V-src, o virus del sarcoma de Rous; v-myc, o virus de la mielocitomatosis, etc. Esta clasificación es válida para oncogenes virales y celulares, sólo se antepone v-onc si son virales o c-onc si son celulares. (46, 5)

Los oncogenes tienen una distribución muy amplia en el reino animal, por lo que se considera que deben tener una función biológica importante. En apoyo a la hipótesis anterior está el hecho de que la estructura de los oncogenes celulares haya sido conservada en el curso de la evolución; se han encontrado en levaduras y el hombre (ras); en Drosophila y vertebrados (src); es decir son copia voluntariosa de genes encontrados en todos los organismos metazoa-rios, lo que implica que tienen funciones primordiales, probablemente durante la diferenciación celular o en la regulación de la división celular. (65, 41, 20, 25, 49)

2. Teorías acerca del origen de los oncogenes.

El estudio del cáncer y la eterna interrogante acerca de su origen y causa, ha sido una preocupación permanente desde tiempos remotos para los grandes filósofos y médicos antiguos, así como para los hombres de ciencia modernos. Con la aparición de la Genética molecular, y el descubrimiento hecho en 1911 por F. Peyton Rous acerca del sarcoma de pollo, se abre un nuevo horizonte para la investigación del estudio del cáncer, involucrando en ésta una extensa familia de genes llamados genes onc ó oncogenes. (53, 49)

Existen alrededor de cien diferentes tipos de cáncer hasta ahora conocidos. La aparente permanencia y transmisibilidad que tienen en común, implica que las células cancerosas resultan de una modificación permanente en el contenido o expresión del gen.

Es posible que los diferentes cánceres se originen por mutación (adición, sustracción, o reacomodo del material genético normal o infeccioso) o por cambio en la transcripción (por una alteración permanente de activación o represión de genes normalmente presentes) o por cambio en la traducción de RNA normal ó viral. De tal manera el cáncer puede ser inducido por exposición a agentes mutagénicos, como radiaciones de alta energía, sustancias químicas e infecciones virales. (27, 39, 52, 84)

En base a lo anterior se ha descrito gran cantidad de hipótesis que tratan de explicar la activación de esos genes que producen cáncer; dos de estas hipótesis para la base genética del cancer son:

1) Hipótesis del Virogene-oncogene. Propone que los genes cancerígenos, los cuales pueden haber sido originados en virus, están normalmente presentes en células en forma inactiva, la inducción del cáncer simplemente requiere de la activación de esos genes.

2) Hipótesis del Provirus-protovirus. Propone que la inducción del cáncer requiere de una infección viral, teniendo en cuenta que los genes requeridos para producir cáncer están normalmente

ausentes, o están presentes pero alterados. (39)

R.A. Weinberg propone una hipótesis de trabajo: "Se supone que la presencia de un oncogén celular es el elemento central para explicar la transformación cancerosa no viral en el hombre; según esta hipótesis ese oncogén derivaría de una secuencia normal e inocua de DNA celular, cuya activación inadecuada (estimulación, inhibición o mutación) le confiere el potencial transformador. Por lo anterior, la clave de la oncogénesis se encontraría con dos elementos fundamentales:

1) La secuencia oncogena emergería de una alteración de la información celular preexistente, consecuentemente, la secuencia oncogena sería endógena, y no una secuencia externa impuesta sobre la célula.

2) La secuencia del DNA que codifica la transformación comprendería sólo una pequeña unidad genética funcional y puede representar una variante alélica de un gen celular normal. Esto implica que la transformación neoplásica dependería de la activación de genes celulares específicos y no de alteraciones de grandes porciones del genoma. (4)

En base a las hipótesis anteriores se involucran dos puntos muy importantes: los genes de cierta clase de virus que infectan a una célula y que bajo cierto mecanismo provocan una alteración en la organización de ésta, sufriendo la transformación de una célula normal a un cúmulo de células hijas totalmente diferentes a la madre; y genes que al parecer son parte de nuestro patrimonio genético que nos hace portadores potenciales de uno o algunos de los diferentes cánceres conocidos hasta hoy. (7)

3. Clasificación.

Los oncogenes se han clasificado de diversas maneras, y de estas sobresalen dos; la primera que se hizo nos habla de la localización de los productos de estos genes, y la otra los agrupa en familias de acuerdo a las características de las proteínas que codifican.

La primera clasificación de oncogenes realizada fue en base a la localización de sus productos génicos: nucleares y citoplasmático. Los primeros son aquellos en que la proteína producida se localiza en el núcleo, mientras los segundos permanece en el citoplasma.

En base a esta clasificación se ha encontrado que los oncogenes nucleares colaboran con los citoplasmáticos en la transformación maligna de células normales; cuando trabajan independientemente no son capaces de inducir una total transformación (según pruebas realizadas en cultivos). Tal es el caso del oncogén nuclear del poliovirus "large T", que se ha encontrado activado simultáneamente con el oncogén citoplasmático "middle T"; los oncogenes nucleares virales Ela, poliovirus, SV40, "large T" y los nucleares celulares myc, N-myc y p53, colaboran con el oncogén citoplasmático ras; los oncogenes nucleares src y myb actúan sinérgicamente con los citoplasmáticos src, erb-B, fos/fps, ras, ros y mlf/raf. (51, 88)

Una anomalía encontrada es el SV40 "large T", el cual a través de una proteína única es capaz de inducir funciones nucleares como la immortalización, y funciones citoplasmáticas como la independencia de sustrato, resaltando que el antígeno "large T" puede ser encontrado tanto en membrana nuclear como citoplasmática, reduciendo su capacidad de inducir immortalización mediante mutaciones que inhiben el transporte del antígeno al núcleo, dejando sin cambio la capacidad de a claje independiente.

La activación de los oncogenes citoplasmáticos parece tener lugar por mutaciones que afectan la estructura de las proteínas codificadas, tal es el caso de ras, src, erb-B, act, fos/fps y new,

con excepción de mos, el cual adquiere el poder oncógeno por unión con un promotor constitutivo. En el caso de ras, se ha encontrado un gran número de mutaciones puntuales que ocurren naturalmente en los tumores, impartiendo a la proteína la capacidad de transformar células, aún cuando se encuentre en niveles muy bajos en el citoplasma. (88, 30)

Los productos de los oncogenes citoplasmáticos se expresan en cantidades relativamente constantes por unidad de tiempo, ligado al estado de diferenciación y crecimiento celular, de manera que las moléculas de proteínas de proto-oncogenes, se encuentran en un estado de diferenciación y crecimiento celular, de manera que las moléculas de proteínas de proto-oncogenes, se encuentran en un estado restringido ó limitado, pudiendo ser activado sólo por ciertos flujos de estímulos. (88)

La duración de los estados excitados de las moléculas de proteínas puede limitarse a minutos o segundos por ciertos mecanismos, tal es el caso de la actividad de guanosina trifosfatasa de las proteínas de ras, la internalización y fosforilación de la c-cinasa del receptor de proteínas codificado por erb-B. Otro mecanismo, aún en estudio, es la retroalimentación negativa que limita fuertemente la longitud del estado excitado de las proteínas codificadas por los genes src y abl. Esto puede deberse por mantener un constante estímulo excitatorio a la molécula de proteína, o estímulo frecuentes que mantienen a la proteína en estado excitado. (88)

En el caso de los oncogenes nucleares, éstos son afectados de diferente manera por las señales estimuladoras del crecimiento. La respuesta de estos oncogenes es mucho más lenta, y sus estados de excitación son más largos: de minutos a horas. (88)

Una clasificación más reciente es la que agrupa a los oncogenes en familias de acuerdo a las características de la proteína que codifican denominadas clases que van de la uno a la cuatro:

- CLASE I a) Proteínas cinasas específicas de tirosina
(fosforilan residuos de tirosina)
b) Proteínas cinasas potenciales
- CLASE II Factores de crecimiento
(derivado del gen para PDGF)
- CLASE III Proteínas que unen nucleótidos de guanina con
actividad de GTPasa.
- CLASE IV Proteínas nucleares, que posiblemente se encuentren
involucrados en la regulación de la transcripción.
- MISCELANEAS Oncogenes de reciente descubrimiento que se
encuentran sin clasificar. (41)

4. Oncogenes virales.

Los virus son los seres más pequeños que existen en la naturaleza, constan de una memoria genética y una envoltura. El genoma puede ser DNA o RNA compuestos de cuatro unidades químicas llamadas nucleótidos que constituyen la información genética guardada en pequeños paquetes llamados genes; se dice que los virus no tienen menos de cinco genes ni más de algunos cientos. (6, 59)

Los virus son hospederos celulares obligados por lo que para su reproducción requieren de la infección de células, las cuales servirán como fuente de fabricación de proteínas virales específicas que darán origen a nuevas copias virales, esto se lleva a cabo por la inserción de genes virales en el genoma celular. (6, 25)

Pero la actividad de los genes víricos integrados no está coordinada con la de los genes celulares que les rodean. (7)

El primer estadio de la expresión de cualquier gen es su copia correcta (transcripción) en RNAm. La transcripción que se efectúa por una enzima llamada RNA-polimerasa comienza en un punto concreto del DNA situado cerca del gen en cuestión, llamado promotor. (25)

El DNA es copiado en una sola dirección y la polimerasa se detiene después de la copia del gen. Todo esto tiene lugar en el núcleo. Seguidamente el RNAm emigra hacia el citoplasma y es traducido por una maquinaria citoplasmática en la proteína característica del gen transcrito previamente. Un virus integrado es transcrito a partir del promotor vírico que le es propio; los RNAm víricos serán seguidamente traducidos en proteínas víricas específicas que son los productos de estos genes. (25)

Los genes víricos en general, son fuertemente activos debido a que sus promotores son muy eficaces. (25) Por lo tanto la región del genoma responsable para la transformación de células en cultivo reside en una pequeña porción del genoma viral, por lo que entre más complejo es el genoma viral la región requerida para la transforma-

ción es más pequeña. (fig. 1) (30)

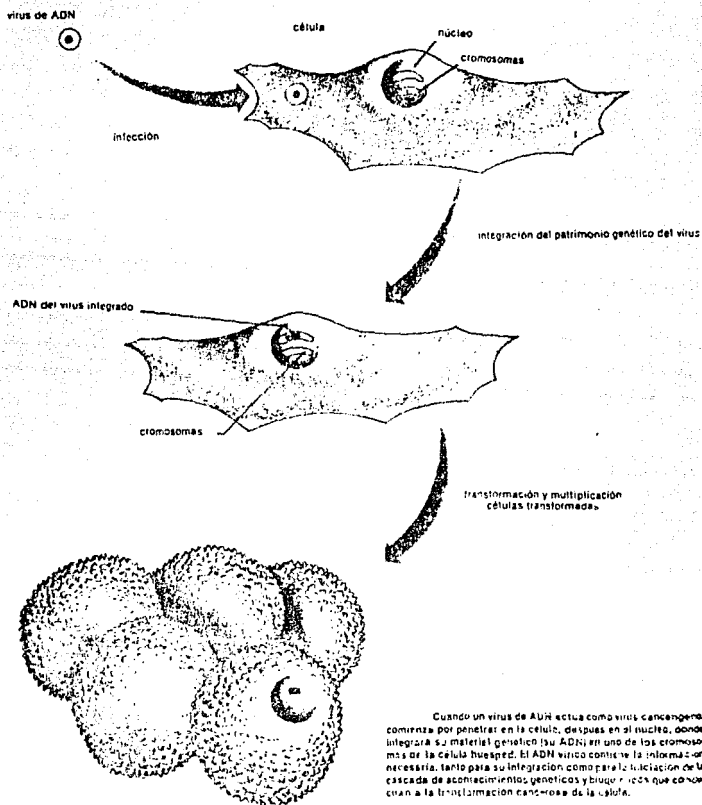


Fig. 1. Dulbecco R.: Mundo Científico; 3: p. 158; 1984.

En 1911, en el Instituto Rockefeller de Investigación Médica, F. Peyton Rous trabajando con tumores de pollo, descubrió que un filtrado libre de células de estos tumores (sarcomas) inoculado a otros pollos, era capaz de producir en poco tiempo tumores con características similares a las del tumor original. (6, 46, 49) Décadas más tarde, con técnicas físicas de purificación y microscopía electrónica se logró identificar al virus causante del sarcoma de Rous (llamado así en honor de su descubridor) lo que hace ganar a Rous el premio Nobel en 1966. (5) Con el descubrimiento y estudio de este virus se encontró que otros eran capaces de producir tumores en animales, así como la presentación de genes responsables de la conversión cancerígena de las células, a los que se les denominó virus onc ó oncovirus. (4, 49), que son copia de genes celulares incorporados en el genoma viral en algún momento de la evolución. (85)

En 1970, el concepto de virus cancerígenos se extiende no tan solo a los virus DNA, si no también a los que contienen RNA como material genético, los cuales siguen el mismo patrón ya descrito para los virus con DNA, a excepción de un paso que ocurre antes de la integración del genoma viral en el celular: la conversión del RNA en DNA. Esto es llevado a cabo por una enzima, descubierta por D. Baltimore y H. Temin, en la matriz del RNA de estos virus llamada transcriptasa inversa, por lo que a los virus con esta característica se les llamó Retrovirus. (ver esquema de infección de un retrovirus, (fig. 2)(5, 20, 25, 46,7).

A los retrovirus se les puede clasificar en tres grupos, de acuerdo al tipo de célula que invaden:

- a) aquellos que provocan cánceres del tejido conjuntivo (sarcomas)
- b) aquellos que producen leucemias, en particular en pollo y ratón.
- c) Virus con propiedades intermedias.

La diferencia de los virus sarcomatogénicos y leucemiogénicos radica en los tipos de células que infectan, los primeros afectan diversos tipos de células del tejido conjuntivo, y los segundos - sólo células de líneas sanguíneas. (25, 46). Las de características intermedias contienen oncogenes, pese a lo cual producen leucemias, es decir, que los oncogenes de estos virus contrariamente a los de los virus sarcomatogénicos, dependen notablemente de otros genes celulares. (46, 5)

PARTICULA VIRAL
DEL SARCOMA DE ROUS

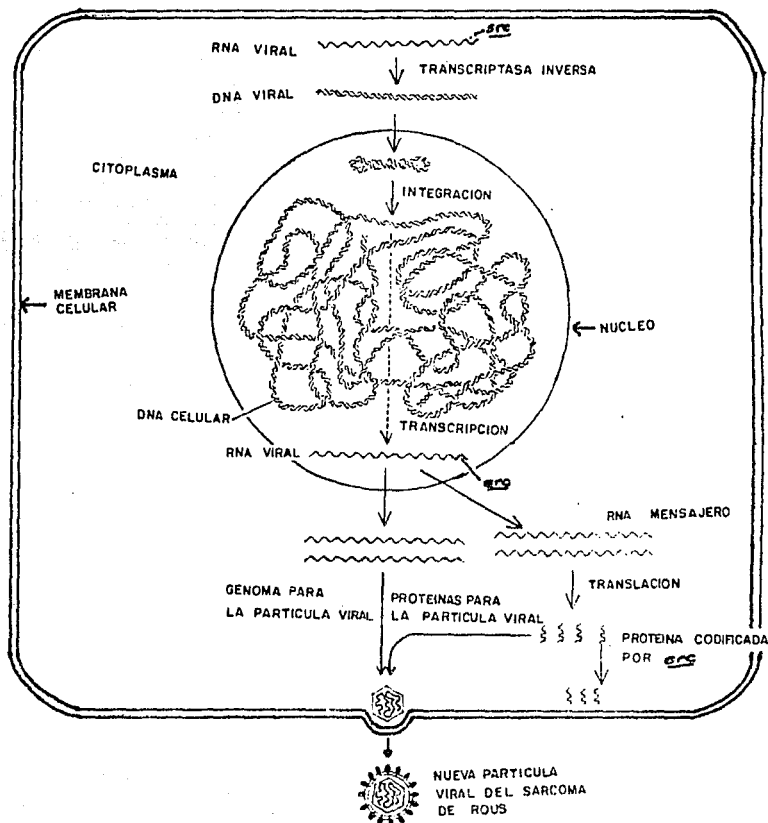
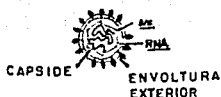


Fig. 2. Bishop J.M.: Sci. Am.: 246: p. 68: 1982

5. Oncogenes celulares.

Los oncogenes celulares son genes celulares con potencial oncogénico, que pueden ser activados como consecuencia de rearrreglos de DNA, y la microfragmentación de éstas moléculas puede separar a estos genes de sus secuencias reguladoras (inhibitorias), permitiéndoles asociarse a genes estimuladores, lo que tendría como resultado una expresión génica anormal y con ello la transformación maligna. (7, 42)

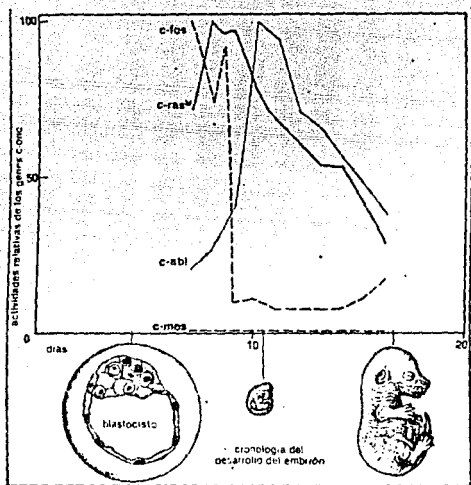
Se ha descubierto que las secuencias de los oncogenes celulares se encuentran dispersas en el cariotipo humano, pero que cada variedad de oncogén parece tener una localización precisa, lo que lleva a pensar que estos genes tuvieron actividad en determinadas etapas del desarrollo embrionario, y fueron reprimiéndose conforme se completó el desarrollo de cada órgano. Quizá su actividad cese o persista a niveles subliminales en las células adultas y bien diferenciadas pero en ciertos casos, y conforme a una demanda específica (como la regeneración hepática), podrían funcionar por un periodo breve para dirigir o estimular la duplicación celular normal. (54)

Lo anterior se confirma con los trabajos realizados por Müller en 1982, con diferentes oncogenes en embriones de rata y pollo, tomados a diferentes estadios de su desarrollo, encontrando que los genes celulares del cáncer son expresados durante cierta etapa del desarrollo y de la diferenciación normales. (fig. 3)

Concluye que posiblemente la función de estos genes sea necesaria en estadios embrionarios, donde muchos son específicos de ciertos tejidos, como es el caso del c-fos, que es el causante de osteosarcomas, y este es materialmente expresado durante el desarrollo del hueso. (4, 62)

La función de los proto-oncogenes en la célula aún no

es completamente conocida, sin embargo la homología entre genes virales y celulares es consistente con la idea de que la transformación neoplásica en algunos casos pueda ser debida al aumento de la expresión de éstos. (21, 30)



La actividad de los genes *c-onc* puede ser estimada con bastante facilidad midiendo la capacidad de los ARN mensajeros totales de una población celular para fijarse específicamente a un segmento radiactivo del gen correspondiente. Con esta técnica, Müller comunicó en septiembre de 1982 en Cold Spring Harbor, en Estados Unidos, los niveles de actividad de diversos genes del cáncer en embriones de ratón tomados en diferentes estados de su desarrollo.

Fig. 3. Duibecco R.: Mundo Científico: 3: p. 176: 1984.

6. Mecanismos de activación oncogena.

El motivo del porque los protooncogenes se activan siguen siendo un misterio, pero varios investigadores coinciden en describir el mecanismo por el cual los proto-oncogenes se transforman en oncogenes:

1) La cantidad de RNAm correspondiente a un determinado oncogen está aumentado; este podría ser el resultado de una falla en la regulación de la transcripción o de una estabilidad aumentada de los RNAm.

2) La amplificación génica es común en células tumorales, por lo que en diversas líneas celulares podemos tener copias múltiples de un cierto proto-oncogen, por lo que la concentración de RNAm, aumenta, no por un desorden o alteración en su transcripción sino porque hay un elevado número de proto-oncogenes en una línea celular, lo que se traduce en la conversión del proto-oncogen a oncogén.

3) Se puede dar una mutación puntual por alguna sustancia carcinogénica, por lo que hay una alteración o cambio en uno de los aminoácidos de la proteína, sin que la cantidad de ésta se vea aumentada, lo que es suficiente para convertir a un proto-oncogén a un oncogén celular. (51, 65, 10)

4) Otra alternativa es una translocación cromosómica como es el caso del c-myc, cuyo promotor es cambiado por secuencias de genes de las inmunoglobulinas. Esto es, los genes que codifican la producción de anticuerpos pueden ser expresados en un alto nivel por las células B. Las secuencias genéticas dentro de los genes que codifican la producción de anticuerpos aumenta la actividad de dichos genes en las células B, al ocurrir una yuxtaposición la expresión de los oncogenes se ve favorecida. (19, 51, 80)

5) La forma de activación de los virus leucemogénicos no es mediante oncogenes, pues carecen de estos en su patrimonio genético. El modo de acción de estos virus es la ocupación del oncogén celular.

existentes, e integrarse en las proximidades de éste, activándolo mediante un promotor vírico, obteniéndose el mismo resultado que con los virus sarcomatogénicos. Sin embargo como en la mayoría de las células infectadas el virus no se coloca en las proximidades de un oncogén, la integración y activación se convierte en un efecto al azar con una probabilidad muy baja, por lo que el desarrollo de una leucemia requiere de un tiempo mucho mayor (varios meses que los sarcomatogénicos. (25)

6) La posibilidad de que una proteína oncógena pueda ser similar a un factor de crecimiento, hace de este otro mecanismo de activación, por lo que las células al ser estimuladas tienden a presentar un crecimiento desmesurado. (42)

7) Por último el hecho de que las proteínas oncógenas pueden en algunos casos presentar actividad enzimática capaz de alterar la arquitectura celular debido a su acción sobre ciertas proteínas clave de la forma celular y del mecanismo de regulación de éste, hacen de estos genes los responsables de la transformación celular.

(3) Dentro de las posibilidades anteriores, surgen algunos mecanismos que por su importancia y estudio son de gran interés.

a. Cinasas.

Las cinasas (del griego kinein "mover") son proteínas con actividad enzimática, que fosforilan proteínas, es decir, catalizan la adición de una molécula de fosfato a otras proteínas; transfieren el grupo fosfato terminal, rico en energía del trifosfato de adenosina (ATP), el principal transportador energético de la célula. (41)

La primera proteína aislada codificada por un oncogén fue derivada de la actividad del gen src, y se trata de una proteína de 60,000 d. de peso molecular y es idéntica a la producida por los oncogenes celulares. Existen otras proteínas de di-

versos oncogenes de las cuales la más conocida es la p²¹ del oncogén ras del sarcoma viral de Harvey. (4, 53)

Lo más importante de estas proteínas es que tienen actividad enzimática, ya que son fosfoproteínas; pensando inicialmente que las cinasas fosforilan específicamente a serina y treonina, este proceso normal se ve alterado por la influencia de la pp60^{src} que fosforila tirosinas, que al igual que serina y tronina también - porta un grupo hidroxilo al que se une al fosfato. Esto es aplicable a la proteína del oncogén abl p¹²⁰, que tiene el mismo efecto.

Se sabe que la pp60 fosforila específicamente a la tirosina, ya que se localiza en las zonas de adherencia, fosforilando a la vinculina, proteína estructural de las placas de adherencia, debilitando su fuerza como elemento conector, liberando los filamentos de actina muy desorganizados ya en las células transformadas presentándose la descamación de las células malignas. Otras muestras de sus efectos son los experimentos de regeneración hepática post-hepatectomía parcial, en los que se encontró elevación del RNAm - del gen ras en las primeras 36 horas siguientes a la resección - hepática, donde se concluye que hay una transcripción controlada del oncogén celular ras durante un proceso de duplicación celular por demanda fisiológica; en el estudio del p21 en el sarcoma de - Harvey, se demostró que existe un cambio en la tripeleta que codifica al aminoácido de glicina: en lugar de guanina se encontró timina, lo que transforma a glicina en valina. Esta sustitución es suficiente para conferirle actividad oncogénica al oncogén del carcinoma de vejiga. (4, 45, 53, 70)

Además de pp60^{src}, los productos de yes, fcr, abl, fps/fes, - y ros, poseen actividad cinasa. Los demás no muestran actividad - cinasa detectable, aunque se cree que los productos de fms, raf, - mil y mos tuvieron hasta cierto punto funciones similares a las - cinasas, y en el caso particular de erb-B se capáz de fosforilar

b. Factores de crecimiento.

La propiedad más llamativa de las células cancerosas es su -
incesante proliferación, debido a un descontrol en el mecanismo -
que regula la división celular. Algunos sistemas de control depen-
den de factores de crecimiento que circulan en sangre. (60)

Los factores de crecimiento son una familia de polipéptidos -
hormonales activos que estimulan potencialmente la proliferación -
celular, si se activan en un lugar o tiempo equivocados, inducen a
la transformación celular. Dos de los más estudiados son el EGF,
(factor de crecimiento epidérmico) y el PDGF (factor de crecimien-
to procedente de plaquetas); que se unen a moléculas receptoras de
superficie de la membrana citoplasmática de la célula. (42)

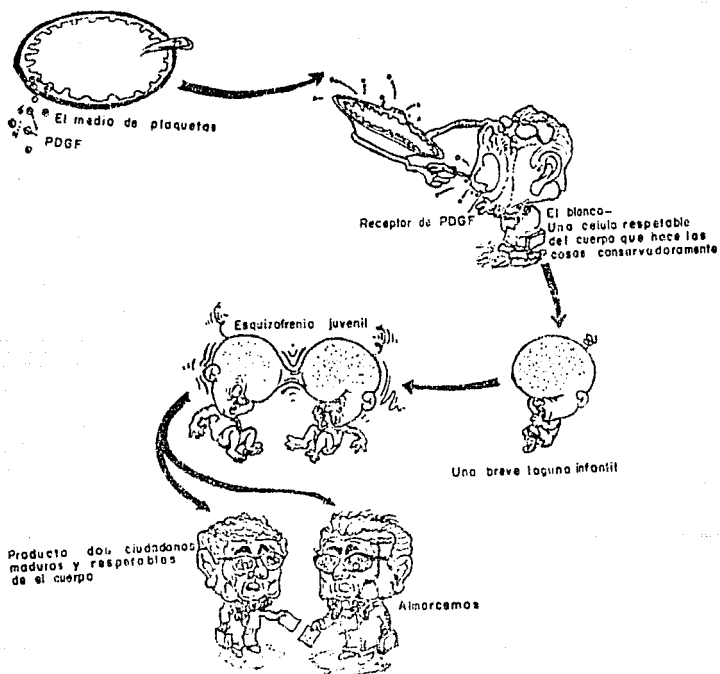
+ PDGF

Es una proteína básica de masa molecular relativa de 30 000 d
con dos cadenas unidas por puentes disulfuro (A y B) y es activo
como un homodímero de A o B y como un heterodímero de cadenas A y
B. (80)

El receptor de PDGF posee una función enzimática similar al
receptor de EGF (descrito más adelante). (fig. 5) (42, 60)

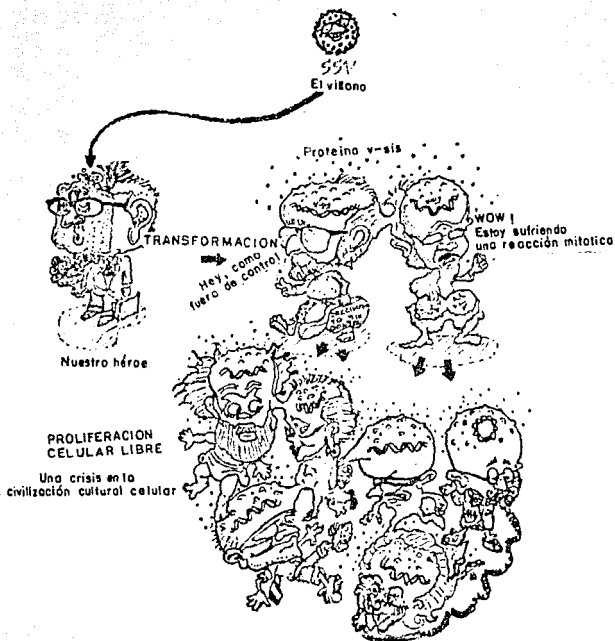
La proteína determinada por el oncogén sis del virus del sar-
coma sismio (VSS), es casi idéntica al PDGF, y al parecer el gen
proto-sis, no es otro que el gen de PDGF, lo que implica que en -
una célula infectada por el VSS prolifera por que sintetiza y excre-
ta un factor de crecimiento parecido al PDGF. (fig. 6) (17, 42)

NOTA: las figuras 5 y 6 son dos esquemas que muestran el me-
canismo de activación del factor de crecimiento PDGF de una manera
amenazadora, por lo que salen fuera de lo convencional; pero considero
que son muy ilustrativos, por lo que se incluyen en el trabajo.



El factor de crecimiento procedente de plaquetas (PDGF), al interactuar con su receptor celular, induce a la división celular en un número y tiempo controlado de células manteniendo la arquitectura celular del tejido al que pertenecen dichas células.

fig. 5. Hunter T.; TIBS: 10: p. 276:1985.



Quando la proteína codificada por el - oncogén sis, provoca una exagerada división celular que lleva como consecuencia la trans formación celular.

fig. 6. Hunter T.: TIBS: 10: p. 277: 1985.

Anticuerpos anti-PDGF, inhiben parcialmente el crecimiento de algunos, más no de todas las líneas celulares transformadas por VSS debido a que esas células secretan un factor de crecimiento tipo - PDGF, por lo que es posible que la proteína de v-s interactue - con el dominio de unión a PDGF, de receptores recientemente sintetizados en compartimientos intracelulares, y que los receptores ligando son inmediatamente internalizados cuando se ha establecido en la superficie de la célula. (42)

Otro producto similar es el producto de neu, que parece una forma alterada de un receptor de factores de crecimiento; probablemente parecido al rPDGF, ya que son de la misma medida y tienen - una actividad de proteínas tirosina cinasa asociada. Ciertas células transformadas producen factores de crecimiento, los cuales despiertan en la transformación celular cuando se les adiciona con contrapartes normales no neoplásicas. (42, 80)

Un descubrimiento reciente, es el hecho que relaciona al - PDGF y conjuntamente al oncogén s con la aterosclerosis, que es una enfermedad que ataca grandes arterias y se desarrolla en muchos años; esta relación es debida al hecho de que PDGF es el mayor mitógeno de las células del músculo liso; debido a que el oncogén - del virus del sarcoma simio es parecido al gen que codifica al - PDGF, no es extraño pensar que cuando sea activado dicho oncogén, aparte de proveer el sarcoma, también favorezca la aterosclerosis. (80)

+ EGF

Presenta una actividad cinasa específica de tirosina, teniendo una función doble, en la que se une al receptor y, además fosforila proteínas celulares. (42, 60) (fig. 7)

El receptor de EGF (rEGF). "es una glicoproteína transmembrana de masa relativa de 17 000d con actividad de proteína tirosina-cinasa dependiente del ligando, cuando se une a EGF, se activan un

número inmediato de procesos bioquímicos tales como la alteración del Ca^{++} libre, intracelular, pH, e incremento en la transcripción de diferentes genes responsables, lo cual culmina horas después en una replicación del DNA y división celular. Si se elimina la actividad tirosina cinasa de 3 oncogenes relacionados v-src; v-ras y v-fbs se elimina la capacidad de transformar la célula..." (14)

El factor EGF posee una secuencia de aminoácidos muy parecidos al producto del oncogén erb-B, cuya proteína es similar al rEGF truncado (le falta la región de unión al EGF) aunque conserva el segmento que atraviesa la membrana y la región catalítica que se introduce a la célula. (42,60,26)

Existen otros productos oncogénicos que pueden funcionar como factores de crecimiento, tal es el caso de v-fms del que su producto es muy similar a la de receptor rEGF, con un dominio largo extracelular, una secuencia única de anclaje, y un dominio citoplasmático que contiene una región homóloga al dominio catalítico del gen src. Así mismo desarrolla actividad cinasa in vitro. La proteína de c-fos se ha identificado como un receptor del factor de crecimiento de células mieloides. (42,60)

+ otros factores.

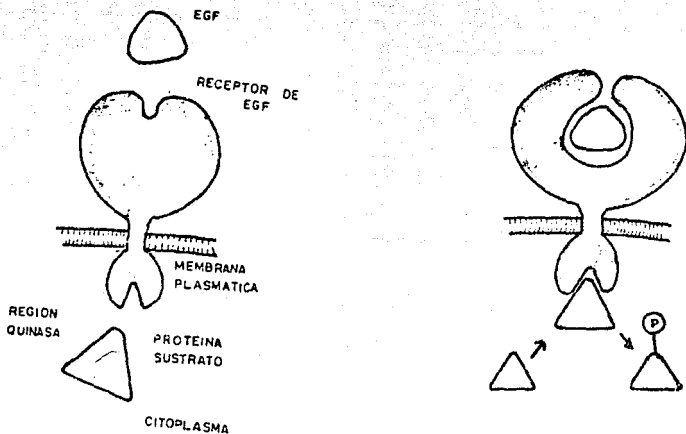
Existen otros factores llamados TGF (factor de crecimiento transformante) que no requieren de sustrato sólido para proliferar y no son inhibidos por contacto célula-célula, pueden transformar fibroblastos y otras células, pero con la característica de que estas regresan a su modelo normal cuando el TGF es removido de estas. (42) Un ejemplo de este tipo de factor es el siguiente.

.. "El factor de crecimiento transformante- α (TGF- α) es un polipéptido el cual es estructuralmente relacionado con el EGF y se une al receptor de EGF. La síntesis del TGF- α ocurre en una variedad de células neoplásicas y durante el desarrollo temprano fetal, pero no se ha reportado en células normales de organismos adultos -

TGF- se ha reportado como un factor de crecimiento embrionario el cual es una propiedad que le permite expresarse en neoplasias. Cultivos primarios de queratinocitos humanos normales sintetizan TGF- , y la adición de EGF o TGF- a esos cultivos inducen la expresión génica del TGF- . Lo que sugiere que un mecanismo de autoinducción existe; análisis de biopsias de piel normal usando hibridización in situ e inmunohistoquímica demuestran la presencia in vivo de RNAm de TGF- y la proteína en el estrato de la epidermis."(15)

Existen tres sitios en la vía del control del crecimiento, en las cuales las proteínas oncógenas pueden influir y estimularles - para crecer;

- 1) La proteína por si misma puede imitar un factor de crecimiento, y la interacción de dicha proteína con el receptor específico puede estimular a crecer a la célula de un modo autócrino.(fig. 8)
- 2) La proteína oncógena puede imitar un factor de crecimiento ocupado, y proveer de una señal mutógena en ausencia de factores de crecimiento exógenos. (fig. 9)
- 3) La proteína oncógena puede actuar como una vía de control de crecimiento celular, desacoplando este por la necesidad de un estímulo exógeno. (42)



RECEPTOR para el factor de crecimiento epidérmico (EGF). Posee una región extracelular que se une al EGF y una región quinasa específica de tiramina (transferrina). Ocupa la posición de una subunidad de EGF cuando se oligomeriza del receptor, acudiendo a la región intracelular a catalizar la fosforilación de una proteína celular sustrato. Las quinatas determinadas por mutación oncogénica pueden realizar la misma actividad enzimática que el receptor, aunque sin recibir una señal adecuada por parte del EGF, lo que determina que la célula alquiere el crecimiento incontrolado característico de las células cancerosas.

fig. 7. Hunter T.: *Inv. y Ciencia*: 97: p.55: 1984

Fig. 8

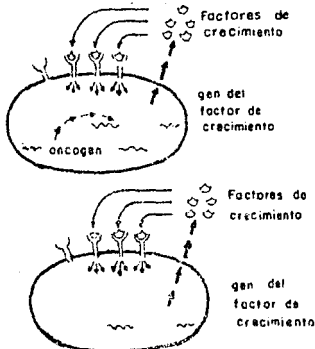


Fig. 9

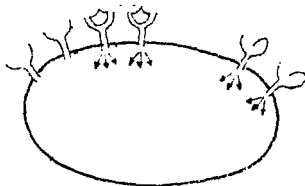


Fig. 8 y 9. Weinberg R.A.: *Science*: 230:p. 774: 1985

c. Amplificación

La amplificación de los oncogenes celulares es uno más de los mecanismos implicados en la transformación cancerosa de las células que incrementan su expresión por aumento de la cantidad de DNA molde para la producción de RNAm. (55). En este fenómeno se presentan dos anomalías citogenéticas:

- a) regiones cromosómicas de tinción homogénea (HSR) y
- b) cromosomas doble minuto (dmins)

confirmados en algunos experimentos de amplificación en células - seleccionadas para pruebas de resistencia a medicamentos amplifican do un gen que codifica una enzima que inactiva fármacos, resultando células resistentes a ellos. (1, 7, 56)

Los dmins aparecen en metafase como esferas pequeñas, parecidas a cromosomas carentes de centrómero. Ocurre frecuentemente en cultivos de células malignas (notablemente en líneas celulares de neuroblastoma), y normalmente desaparecen con la aparición de poblaciones de células clonales que han desarrollado HSR. Estos tiñen - inmediata y uniformemente durante la tinción de tripsina-piensa y se piensa que pueden fracturarse y formar los dmins.

El primer oncogén reportado como amplificado fue c-myc en la línea celular HL-60 de leucemia, amplificada de 3 a 32 veces; en la línea celular COLO-320 de carcinoma de colon, en donde se encontraron alrededor de 30 copias. (21, 56)

Durante el mecanismo de duplicación, parece existir una duplicación espontánea del DNA en células normales en donde varios segmentos de DNA se replican más de una vez por ciclo celular. En - condiciones no selectivas, este DNA es producido, probablemente, - durante el proceso de mitosis, debido a que no se encuentran covalentemente unidos al DNA molde. La incidencia de genes amplificados son fuertemente incrementados por presencia de algunas clases -

sustancias mutógenas (hormonas ó promotores de tumor).

La amplificación no parece ser el evento inicial de la carcinogénesis, ya que el aumento de la expresión y la amplificación de myc y h-myc ocurre durante el progreso del carcinoma del pulmón y las células del neuroblastoma, sin embargo la amplificación de un oncogén favorece y acelera el progreso maligno de células de carcinogénesis inicial (1)

d. Otros mecanismos.

Como ya se ha mencionado, un oncogén puede ser activado por la incorporación de un retrovirus, donde este pasa de un estado inactivo a uno activo y transformante. Otro mecanismo también ya propuesto es la juxtaposición de un cromosoma conteniendo un oncogén con otros, en células B del sistema inmune, de crecimiento rápido caso clásico del linfoma de Burkitt. (14, 71)

Estas uniones erróneas pueden ocasionar varias posibilidades de activación; primero, la transcripción de c-myc a RNA puede alejarse de los controles normales, seguido, de la expresión inapropiada del gen. segundo, las influencias regulatorias provistas para los genes de las inmunoglobulinas pueden afectar la expresión de c-myc y sus niveles pueden resultar más elevados de lo normal. tercero, el daño involucrado en la traslocación de c-myc puede aumentar la estabilidad del RNAm derivado del gen por lo que el RNAm ya existente puede incrementarse y ser menos accesible a una modulación rápida; la estabilidad del RNAm del c-myc parece radicarse en el primer exón del gen y la excisión de este exón por translocación puede ser la raíz del problema. por último, la segmentación de RNAm de c-myc por pérdida del primer exón puede aumentar la translocación del RNA a proteína. (7, 71)

En algunos casos como la inmortalización, debida a una replicación desmedida de un oncogén en la célula, no convierte a la

célula normal en tumoral.

Un mecanismo sugiere la activación de un segundo oncogén para lograr la transformación que caracteriza a la célula cancerosa, por ejemplo:

- MYC y ras
- Act de SV40 y ras. (65)(fig. 8)

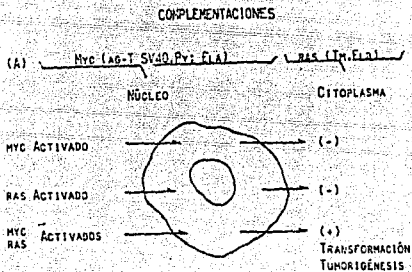


fig 8. La transformación de una célula normal en una cancerosa, no sólo requiere de la actividad de un oncogén, sino de la colaboración de otro.

Océdiz R. et al.: Oncogenes y Cancer;

En 1971, Ohno sugiere que son más frecuentes las mutaciones -
recesivas que las dominantes en los procesos malignos, y agre-
ga que estas mutaciones recesivas pueden ser enmascaradas por even-
tos genéticos que resultan en pérdida del gen no afectado en el
cromosoma homólogo. Este estado de hemigiosis puede surgir de
la pérdida propia del cromosoma homólogo. (36)

M. Barbacid indica que la activación de los proto-oncogenes
celulares puede ocurrir por una gran variedad de mecanismos y -
los agrupa en dos categorías:

- a) aquellos que tienden a incrementar la expresión y el pro-
ducto del gen por otro camino.
- b) aquellos que causan expresión de un producto génico altera-
do.

Otro mecanismo de transformación es mediante la aplicación
de agentes químicos mutógenos. Entre los más conocidos está la
nitroso-metil-urea (NMU), que en un experimento con ratas con pro-
medio de vida entre 50 y 60 días desarrollaron 100% de cáncer de -
mama en un periodo no mayor a 12 meses. En este sistema de modelo
se encontró que los genes transformantes H-ras están presentes en
todos los tumores inducidos. Por clonación molecular de uno de -
esos oncogenes designado NMU-H-ras, permite determinar que el meca-
nismo de activación involucra una mutación única en punto, afectan-
do las propiedades de codificación del codón 12, la misma altera-
ción presentada por el ras aislado en tumores humanos. Sin embar-
go, la exposición a un cancerígeno químico puede permanecer sin -
efecto, hasta que se aplica una segunda sustancia, conocida como -
promotor de tumores, así como la vía y forma de aplicación; una -
inyección de NMU causa tumores pequeños y escasos o nulos, pero si
se refuerza con 3 inyecciones de 3-4 semanas de intervalo, los -
tumores se ven incrementados en tamaño y número. (25, 30, 20)

Las sustancias promotoras como los ésteres del forbol, es--

Principalmente el tetraacenoil-1 α -forbol-13 acetato (TPA), tienen como efecto especial el cambio del estado de diferenciación de las células, teniendo en cuenta que si la acción promotora es débil, los tumores producidos generalmente en piel y glándula mamaria son benignos. (43). El 7,12 dimetil benzantraceno es un inductor de papilomas pre malignos, así como activador de proto-oncogenes, por acción y algunos de los agentes químicos cancerígenos. (4, 77, 64)

7. Características de los oncogenes más estudiados.

A lo largo del trabajo se ha discutido que es un oncogene, como actúa, a que niveles, a que organismos, que producen y a que individuos afectan; pero todo esto ha sido de una manera muy general, por lo que es conveniente hacer una pequeña biografía de aquellos genes que hasta el momento son los más estudiados.

A. Oncogenes virales.

Los virus que por sus características oncógenas se incluyen en este capítulo se clasifican de la siguiente forma:

A. Virus que contienen DNA.

1. Virus no envueltos con doble cadena de DNA y que se replican en el núcleo.

a. Papovavirus.

i) Polipoma y grupo del SV40

ii) Papiloma

b. Adenovirus.

2. Virus envueltos.

a. Héresvirus.

B. Virus que contienen RNA.

a. Retrovirus.

PAPOVAVIRUS.

El nombre de estos virus proviene de papiloma, polioma y vacuola, que describen las actividades oncógenas de estos virus. En general miden de 30 a 50 μ m de diámetro, y son las únicas causas virales conocidas de tumores en el hombre por el momento.

(29)

1) Polyoma: Este virus causa primariamente una infección productiva en células de ratón, y una infección no productiva en células de rata o hamster. (29, 67)

La región transformante del virus del polyoma codifica a tres proteínas conocidas como "Large" (100Kd), "Middle" (55 Kd) y "small" (22 Kd) llamados antígenos T. (7,67)

El antígeno "largeT" juega un papel esencial en el inicio de la síntesis de DNA viral y en la regulación de la transcripción viral, y provoca un crecimiento indefinido celular. (67,6,59,68)

Los antígenos "middle y small" se encuentran alterados en mutantes de la clase hr-t. La proteína "middle" puede formar un complejo con pp60^{c-src}, la proteína cinasa codificada por el oncogén celular src. Esta interacción parece ser esencial para la transformación celular por el virus del polyoma, la intervención de este antígeno en las vías de las proteínas cinasa de la célula es una consecuencia importante en el ciclo de crecimiento del virus, el cual es la inducción de la fosforilación de las moléculas de VP₁, la mayor proteína de la cápside, y estas después son usadas como proteínas ensamblaje del virus. (6, 59, 67)

2) SV40: También llamado virus 40 de los simios, produce sarcoma en el hamster y ependinoma en la rata. (52)

Este virus es comunmente encontrado en tejido del riñon de los monos rhesus y synomolgus, y un virus similar pero no identico se ha aislado de casos humanos progresivos de leucoencefalopátias. (29) El SV40 causa infección productiva en células de mono e infección no productiva en células de ratón y rata, y transformación en células humanas. (29, 67, 82)

La región transformante del SV40 sólo codifica dos proteínas o antígenos T, uno "large" y uno "small" el primero de (94 Kd) y el segundo de (17 Kd). (5, 59) El antígeno T "small" es requerido exclusivamente para iniciar la transformación de células. El

antígeno "small", tiene actividades similares al "large" y Middle" del polyoma; y se ha encontrado que tiene una gran homología en la secuencia de aminoácidos con el péptido de la gastrina, pero esta similitud no es aún conocida muy poco. (5, 59, 41, 42, 30, 68, 59)

Se ha encontrado que la actividad transformante del SV40 en la línea celular de hepatoma humano se incrementa en la presencia de 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA). (43)

3) Papiloma: Su simetría es icosaédrica con DNA circular. Estos virus inducen proliferación epitelial de la capa de Malpighi de la piel y mucosa, se encuentra extendido en las especies vertebradas incluyendo al hombre, y se han descrito alrededor de 30 subtipos. Sus lesiones son generalmente benignas y de regresión espontánea, pero en caso de lesiones genitales estas pueden progresar a lesiones de tipo maligno.

El carcinoma cervical y la displasia cervical, son positivos al papiloma humano 16 (HPV) y 18, el condiloma accuminatum lo es para HPV-6 y HPV-11, con implicación de transmisión de tipo venérea. (6, 18, 29)

ADEMOVIRUS

Produce una amplia gama de enfermedades principalmente de tipo respiratorio, como conjuntivitis folicular, queratoconjuntivitis epidémica, y algunos tumores en hamster. Fueron descubiertos en fragmentos de adenoides infectados con este virus, a lo cual deben el nombre. Se conocen alrededor de 20 a 30 tipos de este virus y miden de 70 a 90 μ m de diámetro, y presentan de 162 a 252 capsómeros de forma icosaédrica. (29, 47)

Requiere de algunas proteínas tempranas que activan genes virales y estas son encargadas de activar genes celulares necesarios para la producción de los componentes de las partículas virales. (59)

La transformación neoplásica del virus requiere la acción combinada de dos dominios conocidos como Ela y Elb. Los productos de Ela son dos proteínas conocidas por su número de aminoácidos, el 243 y 289, y el Elb tiene dos proteínas de 21 y 55 Kd - cada una. El producto de Ela puede sostener un crecimiento indefinido y se ha encontrado estimulando la expresión de genes celulares; pero se requiere de Ela y Elb para el fenómeno de transformación neoplásica. Los productos de Elb, no tiene por si mismos - efecto en el fenotipo celular. (6, 30, 88, 59)

HERPESVIRUS

Son virus icosaédricos de aproximadamente 180 μ m de diámetro y 162 capsómeros. Este grupo pertenecen, el herpes simple H. zoster, el virus de Epstein-Barr y el citomegalovirus, de los cuales el citomegalovirus y el H. simple no se consideran oncogénico. Pueden transformar células en cultivo produciendo en éstas efecto citopático en un tiempo de 24 a 48 hrs. (6, 52)

El herpes simple tipo II se ha relacionado con el carcinoma cervico uterino, debido a que pacientes con este padecimiento presentan anticuerpos contra este virus. Los herpesvirus tumorigénicos afectan el tejido linfóide; como es el caso del EBV que ataca a los linfocitos B y el H. saimiri ataca linfocitos T. (6, 29, 30, 52). El EBV se encuentra relacionado con el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, en estos pacientes se ha encontrado - DNA del EBV en el tumor.

Naturalmente son producidos los éteres de forbol, se obtienen de plantas de la Euphorbiaceae y Thymelacaceae, las cuales - son usadas tradicionalmente como plantas medicinales. El EBV puede infectar células epiteliales aisladas de NPC así como ciertas células epiteliales normales y se ha encontrado evidencia que la - transformación de células epiteliales humanas resultan de la exposición de EBV y la transformación es dependiente de la presencia

de ésteres de forbol. (86)

RETROVIRUS.

Su replicación requiere de 10 a 12 hrs. en condiciones óptimas, su infección está en función de la célula hospedera y del genotipo del virus, por lo que hay sarcomatogénicos, leucemiogénicos y con características intermedias. (ver capítulo 4. Oncogenes virales). El genoma de los virus leucemiogénicos consta de 3 genes "gag" que se encarga de codificar la síntesis de las proteínas virales, "pol" que tiene por función la de codificar la transcripción inversa y "env" que codifica la envoltura del virus; los sarcomatogénicos tienen estos genes más uno llamado "onc" que se encarga de la transformación celular. Algunas características de estos genes se expondrán en el siguiente punto. (6, 25)

b. Oncogenes celulares.

En el capítulo de generalidades, se hace mención de una clasificación reciente en la que los oncogenes se agrupan por clases de acuerdo a las propiedades de las proteínas que sintetizan; en el siguiente cuadro se hace una comparación de las propiedades más importantes de los oncogenes más estudiados hasta hoy; y más adelante se hace una breve biografía de algunos de ellos.

NOMBRE DEL ONCOGEN	PROTEINA ONCOGENICA				
	RETROVIRUS	TUMOR	LOCALIZACION CELULAR	FUNCION	CLASE
<i>src</i>	SARCOMA DE POLLO	---	MEMBRANA PLASMATICA	QUINASA ESPECIFICA DE TIROSINA	CLASE 1 (QUINASAS DE TIROSINA CITOPLASMATICAS)
<i>yes</i>	SARCOMA DE POLLO	---	MEMBRANA PLASMATICA (?)		
<i>fos</i>	SARCOMA DE GATO	---	---		
<i>abl</i>	LEUCEMIA DE RATON	LEUCEMIA HUMANA	MEMBRANA PLASMATICA		
<i>lpy</i>	SARCOMA DE POLLO	---	CITOPLASMA (MEMBRANA PLASMATICA ?)		
<i>fas</i>	SARCOMA DE GATO	---	CITOPLASMA (CITOESQUELETO?)		
<i>ras</i>	SARCOMA DE POLLO				
<i>erb-B</i>	LEUCEMIA DE POLLO		MEMBRANAS PLASMATICA Y CITOPLASMICA	REGION QUINASA CITOPLASMICA ESPECIFICA DE TIROSINA DEL RECEPTOR DE EGF	CLASE 1 (QUINASAS POTENCIALES)
<i>fos</i>	SARCOMA DE GATO		MEMBRANAS PLASMATICA Y CITOPLASMICA	REGION CITOPLASMICA DE UN RECEPTOR DE FACTOR DE CRECIMIENTO(?)	
<i>msi</i>	CARCINOMA DE POLLO		CITOPLASMA	(?)	
<i>raf</i>	SARCOMA DE RATON		CITOPLASMA	(?)	
<i>mos</i>	SARCOMA DE RATON	LEUCEMIA DE RATON	CITOPLASMA	(?)	
<i>sis</i>	SARCOMA DE MONO		SECRETADA	FACTOR DE CRECIMIENTO PARECIDO A PDGF	CLASE 2 (FACTORES DE CRECIMIENTO)
<i>Hg-ras</i>	SARCOMA DE RATA	CARCINOMA HUMANO CARCINOMA DE RATA	MEMBRANA PLASMATICA	UNION AL GTP	CLASE 3 (CITOPLASMICA, UNION AL GTP)
<i>Ki-ras</i>	SARCOMA DE RATA	CARCINOMA, LEUCEMIA Y SARCOMA HUMANOS	MEMBRANA PLASMATICA		
<i>N-ras</i>		LEUCEMIA Y CARCINOMA HUMANOS	MEMBRANA PLASMATICA		
<i>fos</i>	SARCOMA DE RATON		NUCLEO	(?)	CLASE 4 (NUCLEAR)
<i>myb</i>	LEUCEMIA DE POLLO	LEUCEMIA HUMANA	NUCLEO	UNION AL ADN	
<i>myb</i>	LEUCEMIA DE POLLO	LEUCEMIA HUMANA	NUCLEO	(?)	
<i>B-lyd</i>		LINFOMA DE POLLO, LINFOMA HUMANO	NUCLEO (?)	(?)	
<i>src</i>	SARCOMA DE POLLO		NUCLEO (?)	(?)	
<i>raf</i>	LEUCEMIA DE RATO		(?)	(?)	
<i>myb A</i>	LEUCEMIA DE POLLO		(?)	(?)	SIN CLASIFICAR
<i>erb A</i>	LEUCEMIA DE POLLO		(?)	(?)	

PROTEINAS DE ONCOGENES CONOCIDOS. La segunda columna indica el tipo de tumor a partir del cual se aisló el oncogeno. El tercer y cuarto columnas indican el tipo de células en las que se expresan los oncogenes y el tipo de células infectadas. Algunas abreviaturas de oncogenes son: *src* y *fos* indican sarcomas de ratón; *myb* y *myc* indican leucemias de pollo.

El símbolo (?) indica que la proteína oncogénica se encuentra en otros tejidos y manifestaciones. La tercera columna indica si se trata de un oncogeno de tipo celular o de tipo viral y de otros que se expresan en células por virus y en los que se ha podido identificar un oncogeno (MSI) en el caso de amplificar un gen que es un proto-oncogeno en un proto-oncogeno.

ONCOGENES CLASE I Proteínas Quinasas

c-abl

Se localiza en el cromosoma 2 del ratón (4) y en el cromosoma 9 humano, lo contiene el virus de la leucemia murina de Abelson (A-MuLV) (7,47). Induce linfosarcomas de origen de células T en ratón. Produce una proteína de 120 Kd; p120^{abl} y en células de tejido hematopoyético normal produce una proteína de 150 Kd. que precipita con anti-A-MuLV. (7,62).

Se ha relacionado la Leucemia mielocida crónica con este gen celular, debido a que en este padecimiento se encuentra implicada la translocación t(9;22)(q34;q11) característica que da origen al cromosoma filadelfia (Ph) que se encuentra frecuentemente en este tipo de leucemia. En esta translocación interviene la región constante de la cadena ligera de la inmunoglobulina lambda (2A) - que se encuentra en el cromosoma 22 y el c-abl localizado en el cromosoma 9; y debido a que c-abl no es capaz por sí solo de producir el padecimiento, se piensa que existe una alteración estructural de este, por lo que la proteína anormal en conjugación con el gen de (2A) producen la enfermedad. Caso similar ocurre en el linfoma de Burkitt y el oncogén myc (16,7,47,50) Estudios recientes hacen pensar que la proteína de abl pueda ser un receptor transmembrana y tener funciones análogas a algún factor de crecimiento (6,7,10,13)

c-erb-B

Se ha encontrado que el virus de la eritroblastosis aviaria induce tanto eritroblastosis como fibrosarcomas en pollos. El oncogén responsable es erb, y este se encuentra dividido en dos regiones erb-A y erb-B; información reciente indica que el producto de este último es el responsable de la transformación maligna. El producto de erb-B es una glicoproteína de 69 Kd que es precursora intracelular de la proteína modificada gp74^{erb-B}. (30, 38.)

El v-erb-B codifica sólo para la región transmembranal - del receptor de EGF (factor de crecimiento epiférmico y el dominio asociado con actividad cinasa para tirosina, esto sugiere la hipotesis que relaciona la familia de src que incluye v-erb-B en la que se plantea que provenga de secuencias celulares que codifican para receptores de factores de crecimiento y de esta forma se lleve a cabo la transformación a través de la expresión de funciones del receptor sin control. (1,6,7,65,42)

La proteína de v-erb-B está dividida en 3 dominios:

- 1) un dominio a cyado externamente a la membrana plasmática.
- 2) un dominio transmembranal
- 3) Un dominio cinasa cito-plasmático que tiene sitios con actividad cinasa y de autofosforilación; lo que nos hace pensar que el producto de erb-B pueda imitar al receptor de EGF cuando y de esta forma llevar a cabo la transformación celular. (24, 42)

c-fgr

Proviene del virus de sarcoma felino de Gardner-Rasheed (GR-FeSV); es una réplica defectuosa de un retrovirus aislado de fibrosarcoma de gato. Este virus surgió de la recombinación del virus auxiliar de la leucemia felina (FeLV) y secuencias presentes dentro del genoma normal del gato. (63)

Las células transformadas por GR-FeSV expresan una proteína de 70 Kd. la cual es reconocida por anticuerpos de la proteína estructural del virus auxiliar p15, pero no por otros anticuerpos. v70^{GR}Fe-fer es una molécula híbrida que contiene una porción de p15 de FeLV, así como componentes no relacionados con este que son codificados por la secuencia de v-fer, que se encuentra asociado con actividad de tipo tirosina cinasa. (63; 72)

c-fms

Este oncogén proviene del virus del sarcoma felino de McDonough (SF-2eSV). Es un híbrido que contiene secuencias derivadas del gen viral gag en la región del aminoterminal. Produce - glicoproteínas cuya secuencia indica que han sido transducidas - de genes que codifican para receptores de membrana (transmembranales): presentan actividad tirosina cinasa y es muy similar al receptor de EGF. Estas glicoproteínas se dividen en mayor y menor y esta última se encuentra en la superficie celular, mientras que la mayor es un receptor transmembranal cuyo ligando es un factor de crecimiento específico para macrófagos. (1-EGF ó EGF-1.

(6, 12)

c-fos/fes

Estos oncogenes son versiones análogas genéticamente, pero son producidas por diferentes especies.

fes es producido por el virus del sarcoma felino

fos es producido por el virus del sarcoma aviar de

Fujinaga (6, 25)

fes se encuentra en el cromosoma 15 (4) y produce una proteína que se une a diferentes puntos en la membrana (6). Se ha aislado de fibrosarcoma de rató. (72)

La procién 5' del fos no parece esencial para la transformación, sin embargo una delección de esta procién parece reducir la patogenicidad causada por este oncogén. (30)

c-mos

Se encuentra en el genoma de células normales de vertebrados e induce sarcomas en ratón; ha sido detectado en placenta de ratón y se cree juega un papel importante en la embriogénesis.

(62).

Su producto es una proteína cinasa que fosforila treonina y serina en vez de tirosina, como los oncogenes anteriores. (6)
Se ha localizado en el punto de ruptura de la translocación 3:21 asociada a la leucemia mieloblastica aguda. (49)

c-neu

Se ha detectado en neuroglioblastoma de rata; codifica para una glicoproteína de superficie de 135 Kd. asociada a la actividad cinasa. Se cree que el producto de neu es una forma alterada del receptor de algún factor de crecimiento, y el candidato más icónico es el receptor de PDGF, debido a que este y neu son aproximadamente del mismo tamaño y ambos comparten la actividad de tirosina- cinasa. (7, 36)

c-raf/mil.

Los genes raf y mil son las formas murísticas y aviarias del mismo gen. (6)

El oncogén raf fue aislado como el gen transformante del MSV-3611, un retrovirus murino de replicación defectuosa. Estos virus transforman fibroblastos y células epiteliales en cultivo e induce fibrosarcomas en ratones recién nacidos. Usando v-raf se identificaron dos genes relacionados con el DNA humano que son el c-raf-1 que es completamente homólogo al c-raf, y el c-raf-2 es un pseudogen por contener una secuencia relacionada a v-raf que presenta componentes de lectura cerrada de más de 250 nucleótidos y estos genes parecen ser homólogos de v-mil. El c-raf-1 se relaciona con el cromosoma 3 y el c-raf-2 con el cromosoma 4; y el hecho de que c-raf-2 se encuentre en otro cromosoma diferente indica que puede tratarse de un pseudogen en proceso. (2, 83)

El oncogene mil ha sido identificado como un segundo oncogen en el retrovirus aviario que contiene myc, el MSRV está asociado con una alta incidencia de carcinomas de hígado y riñón. Estos

carcinomas pueden ser potencialmente inducidos por el oncogén mil ó una cooperación entre mil y myc. Los productos de mil/raf son - proteínas cinasa que fosforilan serina y treonina en vez de tirosina. (6,8)

c-ros.

Las secuencias de ros sugieren que provienen de genes que codifican para receptores transmembranales. Su producto aumenta la producción de diacilglicerol e inositolfosfato in vivo, también se sabe que fosforila fosfoinositidas por lo que se cree es una fosfotirosina cinasa la proteína para la que codifica. Este oncogén se ha encontrado relacionado con el sarcoma aviario UR11. (6)

c- src

Evidencia genética indica que el potencial oncogénico del - virus del sarcoma de Rous (RSV) reside en un gen único viral designado src. La diferencia del gen celular y el viral de src consiste en que un mínimo de 19 aminoácidos del producto del gen celular ha sido reemplazado con una secuencia más pequeña de tan sólo 12 aminoácidos, lo que contribuye a la actividad transformadora de src. (5, 23). Se creía que este gen era propio del virus y que tenía como función la de dirigir la síntesis de nuevas partículas virales como lo hacen otros genes de los virus, pero se observó que la duplicación de estos virus no se alteran al quitarles el oncogén. La - porción del producto del src que da la actividad cinasa está codificada en el extremo 3' del gen. (23, 65)

El producto de este gen es una fosfoproteína descubierta por Erikson de 60,000 de peso molecular denominada pp60^{src}, la - cual está unida a la membrana plasmática de las células infectadas con RSV, por interacción con un amino terminal. Este - producto está asociado a la actividad cinasa capaz de fosforilar

residuos de tirosina en proteínas acortadas. Una estrecha relación proteica ocurre en células no infectadas de una extensa variedad de vertebrados y es presumiblemente codificada por un gen celular aligado al progenitor de src. (20,53, 65)

ONCOGENES CLASE II Proteínas p21.

Ha-ras, Ki-ras y N-ras.

H-ras, K-ras y N-ras han sido encontrados activados en aproximadamente el 15% de todos los tumores humanos y de un 70-80% en ciertos sistemas tumorigenos inducidos en el animal. Estos oncogenes adquieren sus propiedades transformantes por mutaciones de tipo puntual que afecta la incorporación del aminoácido 12, 61 de sus respectivos productos génicos. (65,30,7,10,78,40,74)

Se sugiere que H-ras es el más comúnmente activado en tumor del tracto urinario y K-ras y N-ras se relacionan más con tumores hematocoyéticos donde H-ras parece ser el más frecuentemente activado y K-ras parece predominar en carcinoma de pulmón y colon. (69)

N-ras se identificó originalmente en células de neuroblastoma, y su actividad transformante puede ser atribuida a pequeños cambios específicos en la secuencia de nucleótidos teniendo como un mínimo de 5 sitios en los cuales el gen ras puede ser activado afectando a los aminoácidos 12 y 13 y del 59 al 61. (20,28,9,34) Estos genes transformantes de células humanas no han sido encontrados en el genoma de los retrovirus. (6)

Estos genes codifican una proteína de 21 Kd llamada p21 y tiene la propiedad de que cataliza su propia fosforilación en treonina más que en tirosina; no depende del ATP como fuente de fosfatos, si no que usa al GTP (Guanosina trifosfato). (41,9,34)

Se ha encontrado que algunas mutaciones crean formas de restricción polimórficas que pueden ser usadas como marcadores moleculares de la rápida transformación de genes ras en células humanas, de esta manera demuestra la presencia de K-ras en dos líneas

celulares derivadas de carcinoma de pulmón y vejiga; obteniendo - resultados similares al analizar la biopsia del tumor de un paciente con carcinoma de pulmón, encontrando que tejido parenquimal y bronquial así como linfocitos del mismo paciente no poseen mutaciones críticas, lo que indica la asociación específica de ras con el desarrollo de ciertos tumores humanos. El oncogén H-ras se encuentra en el cromosoma humano 11p y el K-ras está en el cromosoma 12. (73, 65, 30, 69, 34) (fig. 10)

ONCOGENES CLASE III. Proteínas nucleares.

c-fos.

Proviene del virus del osteosarcoma murina FBJ (FBJ - MuSV) produce una proteína de 55 Kd, y se ha encontrado que participa de forma normal en la diferenciación del hueso. (62) Su región promotora que es un elemento esencial para la activación de la transcripción se localiza entre los nucleótidos 332 y 276 del sitio cap del RNAs. (79)

La conservación filogenética del proto-oncogén c-fos sugiere que el producto de este gen es requerido para procesos metabólicos normales.

Investigaciones en el modelo de transcripción de c-fos en tejidos normales y células, revelan su expresión durante el desarrollo, diferenciación y crecimiento el cual es dependiente de una larga señal externa transferida por factores de crecimiento. (22, 62)

El efecto biológico de la sobreexpresión de fos exógeno está restringido al desarrollo del tejido óseo y de las células T en ratón y recientemente se ha encontrado que el c-fos en embrión de ratón está restringido a las regiones de crecimiento pericondriales del esqueleto cartilaginoso. (22)

La transcripción de c-fos es rápidamente estimulada en -

suero cuando las células han sido previamente tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas como la ciclohexamida y la anisomicina. (79)

c-myb.

La transducción que se lleva a cabo con v-myb y c-myc provoca un corte al final de éstos genes. La mutagénesis insercional de un retrovirus murino en células de leucemia mieloide, duplica esas fracturas separadamente; al extremo 5' de c-myb de algunas instancias y al extremo 3' de otras, sin embargo la combinación de estas dos lesiones en v-myb son considerados para la rápida y aparentemente tumorigénesis producida únicamente por este gen viral. (7)

c-myc.

El c-myc humano normal consta de 3 exones y 2 largos intrones; tanto el primer exón como otras secuencias adicionales de la do 5' están altamente conservados entre la rata y el hombre y es la región más alterada en el linfoma de Burkitt (87, 30, 71, 79), ya que se ha encontrado en los puntos de ruptura de las translocaciones más comunes para esta linfoma: t(8:14)(q24; q32) y las translocaciones variantes t(2:8)(p12q24) y t(8:22)(q24q11). (49, 12, 71, 75) (fig. 11)

El c-myc fue el primer oncogén encontrado amplificado y esto fue en la línea celular HL-60 en donde se encontró amplificado de 8 a 32 veces, lo mismo sucede en la línea celular de carcinoma de colon COLO-32 en donde se han encontrado fracciones de cromosomas llamados amins y regiones cromosómicas de tinción homogénea HSR. (1, 57, 58)

Se encontró que myc sufre una inducción de tipo temporal durante la regeneración hepática después de una hepatectomía parcial, en donde se ve amplificado de 10 a 15 veces. En donde la transcripción de c-myc aumenta inmediatamente después de que las células han sido estimuladas a proliferar, pero esta expresión se basa inmediatamente después que se ha reconstruido con un máximo. Porque la inhibición de la síntesis de proteínas aumenta la inducción del c-myc y al parecer este es el resultado de una proteína hepática pequeña que pasa a ser abundante inmediatamente después de la serie de procesos proliferativos. (2,54,37)

p53.

La proteína p53 es normalmente labil metabólicamente, - tiene como tiempo de vida media menos de 30 minutos. El virus del SV40 es capaz de incrementar grandemente la estabilidad de p53 por formación de un complejo con su antígeno "large" T y p53 resultando una estabilidad metabólica hasta en un 50%. (7)

El proto-oncogén de p53 por si mismo puede activar experimentalmente por fusión con un fuerte promotor resultando un aumento considerable en los niveles de transcripción de la proteína. (33).

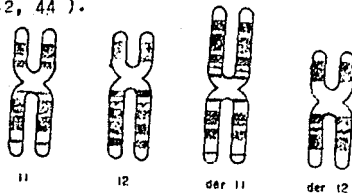
ONCOGENES CLASE IV. Factores de crecimiento

c-sis

El virus del sarcoma de simio es un retrovirus transformante que causa el padecimiento con un corto periodo de latencia. Este ha sido obtenido de primates, de un fibrosarcoma de un mono doméstico (Lagothrix). El producto transformante de SSV es una proteína con peso de 23 kd. llamada p23^{sis}, que es probablemente codificada mayormente por secuencias derivadas de DNA celular de mono. (5,42, (44)).

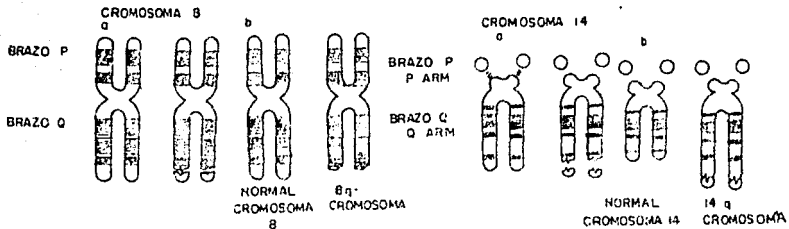
Se ha encontrado que sis está localizado en una región del cromosoma humano 22 y que es translocado en un 90% de leucemia mielógena crónica (MLL) y en algunos sarcomas de Ewing. (4)

El producto del gen c-sis es idéntico en 31 de 31 aminoácidos de una de las secuencias publicadas PDGF; asimismo c-sis codifica una cadena del PDGF. (42, 44).



Translocación característica del oncogén Ha-ras causante del tumor de Wilms

Fig. 10. Reeve E.A.: Nature: 309:p. 175: 1984



Translocación cromosómica responsable del linfoma de Burkitt relacionada con el oncogén c-myc.

Fig. 11. Croce D.M.: Sci. Am.: 225: p. 56: 1985.

CAPITULO III. TECNICAS

1. Técnicas de estudio de los oncogenes.

A lo largo del trabajo se ha hablado mucho de la familia de los oncogenes, pero como es que se ha conocido y clasificado en base a sus características y productos estos fragmentos de material genético?. Esto se ha realizado mediante la aplicación de técnicas de laboratorio a nivel investigación, dichas técnicas provienen de principios básicos que día a día los científicos han ido perfeccionando; como ejemplo tenemos la electroforesis (migración de una molécula cargada electricamente a través de un campo eléctrico), que algún día Tiselius usó para separar proteínas, pero no con el fin de estudiar éstas sino como resultados de estudios de tipo físicos; el inconveniente que esto presentó fue el hecho de que los productos finales de esta, frecuentemente no son puros; por lo que surgió la idea de correr dos electroforesis paralelas con respecto a la primera (electroforesis en dos dimensiones) y obtener de aquellos fragmentos impuros, pequeñas fracciones de mayor pureza.

(81, 35, 16, 28, 31, 42, 32)

De lo anterior han nacido los métodos de recombinación de DNA, los cuales tienen una alta sensibilidad y se pueden detectar mutaciones, diferencias genéticas entre especies, los lugares de unión entre cromosomas translocados. (11, 34, 76, 71, 48)

En consecuencia nace como técnica de recombinación la hibridación in situ, que hace posible el estudio del RNA de células individuales no afectadas por el RNA de otras células en el tejido y en el caso del DNA de cromosomas condensados puede ser usado para mapear sitios de secuencias particulares, así como el DNA del núcleo en interfase puede ser usado para el estudio de la organización funcional de secuencias específicas con la cromatina difusa que caracteriza este estado del ciclo celular. Recientemente apa-

rece publicado el uso de esta técnica en la determinación de infecciones virales en células y tejidos cultivados para herpesvirus, el papillomavirus en tejidos frescos y fijados con formalina de carcinomas cervical, así como el EBV y el citomegalovirus, y la presencia del factor de crecimiento transformante (TGF- α) en el estrato de la epidermis in vivo. (15,11,33,48)

Los problemas que estas técnicas tienen para ser usadas como técnicas de diagnóstico a nivel clínico, es que requieren una intensa labor manual, requieren de tiempo (5 a 10 días) y el uso de radioisótopos que hacen peligrar la seguridad del laboratorio sin contar su costo. (11)

Los problemas presentados anteriormente pueden ser eliminados con el uso de nucleótidos biotinilados como una forma de marcaje que evita el uso de sustancias radiactivas... "Los análogos unidos a biotina de TPP y UTP pueden ser enzimáticamente incorporados a DNA y RNA respectivamente; la prueba de unión a biotina puede ser unida a avidina y complejos de anticuerpos que pueden ser detectados por inmunofluorescencia, inmunoperoxidasa, ó técnicas del oro-inmunocoloidal; sin embargo estas técnicas tienen una capacidad reducida de determinación de secuencias de copias únicas en comparación de las técnicas que ocupan radioisótopos. El uso de polímeros que contengan fosfatasa alcalina de intestino de becerro combinado con biotina pueden ser un paso importante en el desarrollo de técnicas de tipo diagnóstico para la clínica. (11)

2. Técnicas de diagnóstico en laboratorio.

Como ya se ha visto, es necesaria la implementación de técnicas de laboratorio que puedan ser usadas como análisis de rutina para la determinación temprana de aquellos oncogenes que puedan estar expresando, para tratar de eliminarlos ó limitarlos en su desarrollo; y como condiciones básicas para esta implementación se requiere que dichas técnicas, sean fáciles de manejar, rápidas y de costo moderado ó bajo, por lo que las ya descritas anteriormente aun no pueden ser programadas como de rutina; aunque no es difícil que en poco tiempo se consiga usarlas. Por el momento se cuentan con ciertos recursos que pueden ser aplicados en la determinación de algunas enfermedades de tipo oncológico.

Los recursos con que se cuenta son:

-Técnicas citogenéticas.

La inestabilidad cariotípica de las células cancerosas es común, así como anomalías genéticas son presentadas con cierta frecuencia en algunos tumores, en base a lo cual se recurre a la citogenética como posible fuente de diagnóstico. En este tipo de metodologías se ocupa básicamente el cariotipo obtenido a partir de células de médula ósea ó tejidos de fácil acceso como es el tejido hemático, en donde se busca básicamente translocaciones cromosómicas que puedan ser claves en algunos de los padecimientos relacionados con oncogenes, como es el caso de las que aparecen en los cariotipos de pacientes con linfoma de Burkitt y el cromosoma Philadelphia en pacientes con leucemia mieloide crónica. (19,7,62,16,47, 12,76)

Dentro de ese cariotipo también se puede encontrar con una anomalía a los mins (dobles minutos) que nos indican la amplificación de un gen, como sucede en el caso de c-myc, de quien en general son característicos dentro de células transformadas con este oncógeno. De la misma forma se pueden encontrar las HSR

(regiones de tinción homogénea) en cariotipos teñidos con la técnica de plasma tripsina(55), estas regiones se asocian con la - amplificación oncogénica y con células que presentan resistencia a fármacos. (1,7,59,55)

Existen métodos más sensibles para la determinación de la expresión de los oncogenes, especialmente ras y myc, primeramente se tiene por cuantificación de los niveles de RNAm, pero esto es muy laborioso y la información es indirecta, por lo que no es - precisa.(61)

- Técnicas inmunológicas.

Esta metodología va encaminada a la cuantificación de los productos proteínicos de estos oncógenos, como ejemplos tenemos el inmuno (Western) blotting, inmunoprecipitación e inmunoquímica del nivel de copia única, estos procedimientos se llevan a cabo típicamente y ninguno es verdaderamente cuantitativo, además de que el - Western blotting y la inmunoprecipitación son frecuentemente poco sensibles para la determinación de oncoproteínas en células no - transformadas. (61,52,29)

Recientemente Horan Hand ha desarrollado un radioinmunoanálisis con un líquido que une al gen ras y los productos del proto-oncogene. Este análisis detecta proteínas ras puras en el orden de 0.1 a 1 ng. teniendo valores de moléculas por célula de la proteína de ras de 68,000 para NIH-3T3 fibroblastos, 680,000 para fibroblastos transfectados con v-Ha-ras, y 82,000 para células del carcinoma de vejiga humano T24 que contiene la proteína mutada del - Ha-ras, sin embargo estos resultados varían y aun no es posible - establecer con certeza los niveles normales de esta proteína.(61)

Un análisis más rápido y menos costoso que el anterior es la aplicación de ELISA para la determinación de las proteínas de - c-myc y N-myc. La sensibilidad de esta técnica usando puntos de - calibración cantidades de la proteína de c-myc purificada de un -

lisado bacteriano (bp62^{C-myc}) como límite es de 3 pg, pero la sensibilidad máxima está en el rango de 100 pg a 1 ng. La principal desventaja de ELISA para myc es que el producto final coloreado de la reacción no provee más información que una banda de un gel y - sólo se tiene que los anticuerpos usados para esta prueba sólo reconocen auténticas proteínas de myc. Es probable que más adelante esta técnica pueda ser implementada en el laboratorio de diagnóstico para oncoproteínas y otras proteínas de interés clínico. (61)

CAPITULO IV. EPILOGO

1. Comentarios al presente trabajo.

La oncología es una ciencia relativamente nueva, (más no la enfermedad); que se encuentra aún en etapa de estudio y reconocimiento de las causas generadoras, aún con grandes necesidades de investigación y conocimientos para poder desarrollar una terapia eficaz para este tipo de enfermedades.

El sabernos portadores potenciales de una gran variedad de enfermedades oncológicas, debe hacernos reflexionar y difundir esta nueva área de investigación aquí en México y entre los alumnos de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo con orientación en genética, primeramente, para que ellos con los recursos que se cuenta en la escuela se puedan implementar técnicas de estudio aplicables al laboratorio clínico con el fin de detectar tempranamente algunos de los padecimientos y de alguna forma de inhibir o reprimir la expresión de estos genes y el progreso de dichas enfermedades.

2. Conclusiones.

En base a lo ya revisado a lo largo del trabajo podemos concluir lo siguiente:

La activación de aquellos genes involucrados en problemas de tipo oncológico, no es causado por un agente en especial, si no que depende de una serie de factores tales como los ambientales, el estado físico y genético del individuo etc., lo que en conjunto sean capaces de activar por alguna vía ya descrita la expresión errónea de estos genes.

En consecuencia con lo anterior, los mamíferos y vertebrados nos convertimos en portadores potenciales de una o varias enfermedades oncológicas, debido a que dentro de nuestro patrimonio genético se encuentran estos genes, que paradójicamente en algún momento de nuestra vida se encontraron activos para dirigir la formación y/o

crecimiento de algún órgano u organismo. Sin embargo hay que tener en cuenta que debe haber una predisposición genética por parte del individuo, para contraer algún tipo de enfermedad relacionada, ya que estas no se contagian de persona a persona, denotando que para que esto ocurra deben existir una serie de eventos relacionados que juntos favorezcan la activación de un oncogén o varios y su expresión se vea traducida en enfermedad.

Agradecimiento especial a:

Mi hermano Rodolfo, Elida, Jaime Alberto y Juan Carlos por su colaboración técnica en la realización de este trabajo.

FOR INFO
CALL 1-800-368-5878

CAPITULO V BIBLIOGRAFIA

1. Alitalo K.; "Amplification of cellular oncogenes in cancer cells"; TIPS; 10; 194-197; 1985.
2. Ar-Rushi A., et al.; "Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Purkitt's Lymphoma"; Science; 22; 390-393; 1983.
3. Pell J.C., et al.; "Ablason-transformed fibroblasts contain nuclear phosphotyrosyl-proteins which preferentially binds to murine DNA"; Nature; 325; 553-554; 1987
4. Penitez P.I.; "Oncogenes"; Revista Médica del IMSS; 22; 53-59; 1984.
5. Pishon J.M.; "Oncogenes"; Scientific American; 246; 69-78; 1982.
6. Pishon J.M.; "Viral Oncogenes"; Cell; 42; 23-38; 1985.
7. Pishon J.M.; "The molecular genetics of cancer"; Science; 235; 305-311; 1987.
8. Ponner T. et al.; "The human homologs of the raf (mil) oncogene are located on human chromosomes 3 and 4"; Science; 223; - 71-74; 1984.
9. Pos J.I. et al.; "Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers"; Nature; 327; 293-297; 1987.
10. Powden G.C.; "Chemical Carcinogenesis and the oncogenes - A Chemical pathology study section workshop"; Cancer Research; - 45; 914-918; 1985.
11. Caskey T.C.; "Disease Diagnosis by recombinant DNA methods"; Science; 236; - 1223-1229; 1987.
12. Chazanti P.S. et al.; "Specific translocations characterize Purkitt's Lymphoma of homosexual men with the acquired immunodeficiency syndrome"; Blood; 61; 1269-1272; 1983.
13. Chan I.C. et al.; "A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia"; Nature; 325; 635-637; 1987.

14. Chen F.S. et al.; "Requirement for intrinsic protein tyrosine kinase in the immediate and late actions of the EGF receptor", *Nature*; 328; 820-823; 1987.
15. Coffey R.J. et al.; "Production and auto-induction of transforming growth factor- α in human keratinocytes;" *Nature*; 328; 817-820; 1987.
16. Collins S.J. et al.; "Altered transcription of the c-abl oncogene in Y-562 and other chronic myelogenous leukaemia cells"; *Science*; 225; 72-74; 1984.
17. Collins T et al.; "Alternative RNA splicing affects function of encoded platelet-derived growth factor A chain;" *Nature*; - 328; 621-624; 1987.
18. Crawford I.; "Papilloma viruses, an cervical tumours"; *Nature*; 310; p. 16; 1984.
19. Croce M et al.; "Chromosome translocations and human cancer"; *Scientific American*; 225; 54-60; 1985.
20. Dahlitz J.; "What do oncogenes do?"; *Science*; 223; 673-674; 1984.
21. Dalla-Pavera R. et al.; "Onc-gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient;" *Nature*; 229; 61-63; 1982.
22. Dony C. et al.; "Proto-oncogene c-fos expression in growth regions of fetal bone and mesodermal wet tissue;" *Nature*; 328; 711-715; 1987.
23. Dolberg D.S. et al.; "Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo"; *Nature*; 309; 552-556; 1984.
24. Downward J. et al.; "Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences;" *Nature*; 307; 521-527; 1984.
25. Dulbecco R.; "La naturaleza del cáncer"; *Fundo científico*, 3; 168-179; 1984.

26. Farn S.; "Epidermal growth factor receptor yet another domain?" *Nature*; 309; 209-210; 1984.
27. Emery A. E.H., Genética Médica, 4a. Ed., Edit. Interamericana, 1978.
28. Feig L.A. et al.; "Somatic activation of ras^K gene in a human ovarian carcinoma"; *Science*; 223; 698-700; 1984.
29. Freeman P.A., Textbook of Microbiology, 21a. ed., Edit. W.P. - Saunders Company, 1979, USA.
30. Fujinaga F.; "Viral transforming genes and oncogenes - origin, structure, and function"; *Cancer Research*; 45; 2392-2394; 1985.
31. Fujita J. et al.; "src-ras oncogenes are activated by somatic alterations in human urinary tract tumours"; *Nature*; 309; 464-469; 1984.
32. Gardiner F & Patterson D.; "Transverse alternating electroosmosis"; *Nature*; 331; 371-372; 1988.
33. Hames P.D. et al.; Nucleic Acid Hybridisation, 1a. Ed., Edit. IRI Press, 1978, Inlaterra.
34. Henley M.R. et al.; "The ras gene transformer and transducer"; *Nature*; 328; 668 ; 1987
35. Herber M.P. et al.; "Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization , *Chromosome*"; 83; 431-439; 1981.
36. Harris H.; "Malignant tumours generated by recessive mutations" *Nature*; 323; 582-583; 1986.
37. Hayman M.J. et al.; "Identification of a form of the avian - erythroblastosis virus erb-B gene product at the cell surface", *Nature*; 309; 460-462; 1984.
38. Hayday A.C., "Activation of a translocated human c-myc gene - by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus"; *Nature*; 307; 334-340; 1984.
39. Herskowitz I.H., The elements of genetics, McMillan published Co., Inc., 1979, USA.

40. Hirai H. et al.; "A point mutation at codon 13 of the R-ras - oncogene in myelodysplastic syndrome"; Nature; 327; 430-432; 1987.
41. Hunter T.; "Proteínas de Oncogenes"; Investigación y ciencia; 97; 48-58; 1984.
42. Hunter T.; "Oncogenes and growth control"; TIPS; 10; 275-280; 1985.
43. Imbra R.J. et al.; "Phorbol ester induces the transcriptional - stimulatory activity of the SV40 enhancer"; Nature; 323; 555-557; 1986.
44. Josephs S.F. et al.; "Human proto-oncogene nucleotide sequences corresponding to the transforming region of simian sarcoma virus"; Science; 223; 487-490; 1984.
45. Yemps M.P. et al.; "Direct evidence that oncogenic tyrosine - kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites"; Nature; 310; 589-591; 1984.
46. Fiseliev P.; "La Biología molecular del cáncer"; La ciencia - en la URSS; 32; 11-18; 1987.
47. Flein A. et al.; "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia"; Nature; 300; 765-767; 1982.
48. Frontiris T.G.; "The emerging genetics of human cancer"; The New England Journal of Medicine; 309; 414-419; 1983.
49. Frump M.A. et al.; Diagnóstico clínico y tratamiento, 20a. Ed., Edit. El Manual Moderno, 1985, México.
50. Furzroch R. et al.; "A novel c-sbl protein product in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia"; Nature; 325; 631-635; 1984.
51. Iand H. et al.; "Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis"; Science; 222; 221-222; 1983.
52. Lynch M.J. et al., Métodos de laboratorio, 2a.ed. Edit. Interamericana, 1984, México.

53. Mc Grath J.P. et al.; "Bacterial expression of an enzymatically active protein encoded by RSV src gene"; Nature; 295; 423-425; 1982.
54. Makino R. et al.; "c-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by ciclohexamide treatment"; Nature; 310; 697-698; 1984.
55. Vázquez M.F. et al., Manual de Citogenética humana, 2a. ed., Edit. La Prensa Médica Mexicana, 1979, México.
56. Marx J.I.; "Oncogenes amplified in cancer cells"; Science; 223; 40-41; 1984.
57. Marx J.I.; "Tumor-Prone mice and myc"; Science; 226; 823; 1984.
58. Marx J.I.; "Viruses yield clues to gene regulation"; Science; 1006-1009; 1984.
60. Massague J.; "The transforming growth factors"; TIBS; 10; 237-240; 1985.
61. Moore J.P. et al.; "Immunoassays for oncoproteins"; Nature; - 327; 733-734; 1987.
62. Muller R. et al.; "Differential expression of cellular oncogenes during pre; and postnatal development of the mouse"; Nature; 299; 640-644; 1982.
63. Naharro G. et al.; "Gene product of v-fgr onc: Hybrid protein containing a portion of actin and tyrosine specific protein-kinase"; Science; 223; 63-66; 1984.
64. Ocañiz R. et al., "oncogenes y Cáncer".
66. Peterson P.; Oncología, la. ed., edit. MIR, 1982 URSS.
67. Pfister H.; "Biology and Biochemistry of papillomaviruses"; Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.; 99; 111-118; 1984.
68. Prelich G. et al.; "The cell-cycle regulated proliferating-cell nuclear antigen is required for SV40 DNA replication in vitro"; Nature; 326; 471-477; 1987.

69. Pulciani S. et al.; "Oncogenes in solid human tumours"; Nature: 300: 518-542; 1982.
70. Purcio A. F. et al.: "Site-specific increased phosphorylation of pp60^{v-src} after treatment RSV-transformed cells with a tumour promoter"; Science: 229: 1393-1395; 1985.
71. Rabbitts T.H. et al.: "Effect of somatic mutation within translocated c-myc genes in Burkitt's lymphoma"; Nature: 309: 592-597; 1984.
72. Rasheed S. et al.: "Origin and Biological properties of a new feline sarcoma virus"; Virology: 117: 238-244; 1982.
73. Reeve A. E. et al.: "loss of a Harvey ras allele in sporadic Wilm's tumour"; Nature: 309: 174-179; 1984.
74. Raymond C.D. et al.: "Phenotypic changes induced by a mutated ras gene during the development of Dictyostelium transformants"; Nature: 323: 340-343; 1986.
75. Robertson M.: "Message of myc in context"; Nature: 309: 585-587; 1984.
76. Rosson D. et al.: "Transcription of hematopoietic-associated oncogenes in childhood leukemia"; Cancer Research: 43: 3912-3918; 1983.
77. Rubin H.: "Mutations and oncogenes-cause of effect"; Nature: 309: 518; 1984.
78. Santos E. et al.: "Malignant activation of a K-ras oncogene in lung carcinoma but not in normal tissue of the same patient"; Science: 223: 661-664; 1984.
79. Sassone, Crosi et al.: "Modulation of c-fos gene transcription by negative and positive cellular factors"; Nature: 326: 507-510; 1987.
80. Scott J.: "Oncogenes in atherosclerosis"; Nature: 325: 574-575; 1987.

81. Spragg S.P.: "two-dimensional electrophoresis": Nature: 328: 485-486: 1987.
82. Steull C.H. et al.: "Myristic acid in coupled to a structural protein of polyoma virus and SV40": Nature: 326: 619-621:1987.
83. Suttrave P. et al.: "Nucleotide sequence of avian retroviral oncogene v-mil¹: homologue of murine retroviral oncogene v-raf" Nature: 309: 85-88: 1984.
84. Tabin C.J.: "Mechanism of activation of a human oncogene": - Nature: 300: 143-149:1982.
85. Temin H.M.: "We still don't understand cancer": Nature: 302: - 656: 1983.
86. Tomei L.D. et al.: "Phorbol ester and Epstein Barr virus - dependent transformation of normal primary human skin - epithelial cells: Nature :329: 73-75: 1987.
87. Watt R. et al.: "The structure and nucleotide sequence of the 5' end of the human c-myc oncogene": Genetics: 80: 6307- - 6311: 1983.
88. Weinberg R.A.: "The action of oncogenes in the cytoplasm - and nucleus": Science: 230: 770-776:1985.
89. Wyngaarden J.B. et al., Tratado de Medicina Interna de Cecil-Loeb, 16a. ed. Edit. Interamericana, 1985, México.