

29/133



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Creación de un texto sobre el estudio teórico-
bibliográfico del oncogene c-ras

TESIS DE LICENCIATURA

Que para obtener el título de

BIOLOGA

Presenta:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ADILIA ELIZABETH MARTINEZ INIGUEZ

México, D. F.

1989



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.

INDICE

Introducción	1
Método	3
Objetivos	4
Oncogenes	5
y ras	234
Proto-oncogenes y ras	46
ras en otras especies	66
Características de las proteínas ras	88
Función de p21 proto-oncogénica	112
Oncogene ras en transformación celular	139
ras en carcinogénesis animal	177
Oncogenes ras en humanos	188
Conclusiones y Perspectivas	206

INTRODUCCION

El cáncer es un serio problema de salud a nivel mundial. En México se calcula que mueren aprox. 50,000 personas de cáncer. Al año, la mayoría en edad productiva, de 30 a 50 años, cifra que seguramente aumentará en los próximos años, debido a la disminución en la incidencia de enfermedades infecciosas así como al incremento en el promedio de vida de la población. El cáncer ha resultado ser un desafío para los científicos desde que su estudio se inició por ser una enfermedad con un alto índice de mortalidad, cuya prevención y tratamiento han progresado muy lentamente. Hasta el momento, los avances en esta materia son relativamente pocos. En los últimos años ha surgido una nueva área de estudio del cáncer, llamada Oncología Molecular, que estudia las alteraciones a nivel genético asociadas a procesos neoplásicos y se basa en el estudio de los ONCOGENES, genes involucrados en desarrollos transformantes. El estudio de los oncogenes se ha intensificado los últimos años, principalmente desde 1980, cuando se empezaron a describir varios oncogenes estudiados de manera exhaustiva a partir de entonces en muchos de sus aspectos. Actualmente se siguen describiendo y estudiando nuevos oncogenes.

Un índice del interés que se ha generado en muchos laboratorios por el estudio de los oncogenes, es el incremento del número de artículos publicados sobre el tema. Para conocer este índice y contar con un elemento de consulta es necesario un registro con la cita bibliográfica de cada artículo; este registro es el Archivo Bibliográfico de Oncogenes, que incluye las revistas científicas más accesibles y reconocidas; en él se reportan los datos siguientes:

No. de Artículos	AÑO
153	1978
213	1979
250	1980
258	1981
428	1982
551	1983
808	1984
917	1985
1011	1986
1413	1987

Estas cifras, si bien proporcionan una idea de la cantidad de trabajos desarrollados sobre el tema, no permiten sin embargo, apreciar la variedad de los mismos, que siendo tantos y tan diversos suelen crear gran confusión a quien intenta introducirse por primera vez en este nuevo y fascinante campo. Puesto que son tantos los laboratorios en todo el mundo en donde se realizan investigaciones de esta naturaleza, la emisión de publicaciones resulta abrumadora para quien inicia su estudio en esta área.

En nuestro país se han empezado a investigar las alteraciones de oncogenes en muestras de las neoplasias con mayor incidencia a nivel nacional (leucemias, tumores cérvico-uterinos, mamarios, etc.), es de esperar que este tipo de trabajos aumenten prósperamente y que cada vez más investigadores se interesen por iniciar sus estudios en todo lo referente a la Oncología Molecular.

Por todo lo anterior, resulta necesario elaborar un texto en el que se reúna, integre y estructure de la manera más accesible, la información que hasta el momento se tiene sobre uno de los oncogenes más importantes y estudiados: El oncogene ras. Este oncogene es muy importante por la frecuencia con la que se ha detectado activo en diversos tipos de cáncer y por encontrarse en organismos tan alojados evolutivamente como las bacterias, levaduras, y humanos. El texto en cuestión recopila la información más relevante, estructura una secuencia de conocimientos, explica, y da a conocer los principales hallazgos sobre el oncogene ras, para que toda persona que se interese al respecto e intente su estudio por vez primera, adquiera la información requerida, sintetizada y actualizada, sin confundirse con el gran número de artículos tan específicos y variados referentes al oncogene ras.

METODO

Debido a que no existe un texto que trate lo que hasta el momento se conoce sobre el oncogene ras, para la elaboración del presente texto fue necesario empezar por integrar un archivo de artículos de oncogenes, para lo cual se empleó una computadora Apple IIe con el programa Data-Fax, que archiva la cita bibliográfica y el resumen de cada artículo. Se realizó un listado en varias bibliotecas (de la UNAM y del CINVESTAV) para reunir toda la información que posteriormente se archivó en computadora. Este archivo se encuentra en el departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I. P. N. En este archivo, que cuenta con más de 4000 citas, se consultó la información de los artículos mencionados en la Introducción.

En el archivo de artículos de oncogenes, se consultaron los artículos referentes al oncogene ras, y con la información obtenida se integró el presente texto.

El objetivo de este texto es proporcionar la información más importante, actualizada y completa acerca de este oncogene, pero también se pretende que sea lo más clara y accesible al lector. Para ello, se crearon dos secciones:

(1). Texto. En esta primera sección se explica lo que en general se ha descubierto hasta la fecha sobre el oncogene ras, y se divide a grandes rasgos en una primera parte de introducción a los oncogenes, una descripción de los oncogenes ras virales, los proto-oncogenes ras; estructura, proto-oncogenes ras de otras especies y función, y una última parte de oncogenes ras en trabajos *in vitro*, *in vivo* y en humanos.

(2). Resúmenes. A fin de complementar y profundizar aún más en los conocimientos expuestos en la sección anterior, al final de cada capítulo se enlista la bibliografía con una modalidad se incluye el resumen de cada artículo al que se haya hecho referencia en el texto. El resumen no es simplemente una traducción literal del que se incluye en el artículo original, sino un resumen elaborado para resaltar lo importante, de acuerdo a lo mencionado en el texto para no perder continuidad aunque procurando mantener la individualidad de cada resumen, de tal manera que quien desee leer solo algún resumen en particular no necesariamente tenga que recurrir al texto o a otros resúmenes.

Este formato, con dos secciones, permite a la vez una lectura fluida y comprensible, pero sin excluir datos importantes que complementen la información.

El presente estudio se concreta al oncogene ras, por la imposibilidad de realizar un trabajo tan completo con los demás oncogenes que se conocen dada la cantidad de información; sin embargo en el archivo de oncogenes se cuenta con lo necesario para realizar estudios similares sobre otros oncogenes también importantes.

OBJETIVOS

- Proporcionar a quien aprenda por vez primera el estudio de la Oncología Molecular en nuestro país, y en particular del oncogene ras, un texto accesible que facilite la adquisición de conocimientos.

- Recopilar e integrar la información más importante que existe acerca del oncogene ras.

- Crear un texto estructurado, actualizado y completo que facilite el estudio de ras.

ONCOGENES

Los oncogenes son secuencias genéticas involucradas en procesos neoplásicos. Se considera que su estudio se inicia a partir de 1977, cuando se describió el primer oncogene retroviral, pero ya desde antes existía su existencia, por varias razones:

- La naturaleza hereditaria de algunos tipos de cáncer,
- La relación entre mutagenesis y carcinogenesis,
- La relación entre virus y cáncer, y

Las aberraciones cromosómicas encontradas en algunas células cancerosas (Yunis, 1983).

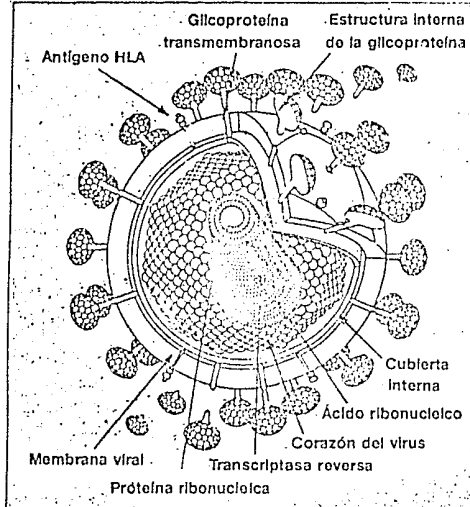
Al intentar identificar los virus que inducían el desarrollo de tumores en animales experimentales se estudiaron los genes virales responsables de tal inducción, y así se encontraron 2 genes transformantes en el virus SV40, los que se denominaron antígenos-T, por transformantes, el antígeno T-grande y el antígeno-T pequeño. Posteriormente se encontraron otros 3 antígenos-T en el virus oncogénico polioma. El estudio de estos genes generó un interés muy grande, pero surgieron algunos problemas, pues estos genes transformantes también participan en los procesos intrínsecos virales y al introducir alteraciones en dichos genes se altera toda la maquinaria viral lo que dificulta su estudio y además estos virus generalmente provocan la muerte de las células que infectan complicando su manejo en el laboratorio.

Mientras algunos investigadores trataban de solucionar estos problemas, otros se dedicaban a estudiar virus oncogénicos distintos pertenecientes a los llamados retrovirus, que se caracterizan por tener un genoma formado por ARN. Los retrovirus presentan algunas ventajas con respecto a los virus SV40, polioma, adenovirus y otros virus transformantes con genoma de ADN: El tamaño de su genoma es menor, no causan la muerte de las células que infectan, lo que facilita su manejo en el laboratorio y sus oncogenes no interfieren con el resto de la maquinaria viral lo que permite estudiar sus oncogenes en forma independiente de otras funciones virales. El primer oncogene retroviral descrito fue el del virus de sarcoma murino de Rous llamado src, por sarcoma (Brugge y Erikson 1977).

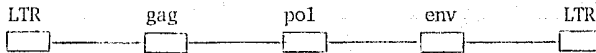
En la actualidad, la mayoría de los oncogenes virales descritos son de retrovirus, aunque no todos los retrovirus poseen oncogenes; algunos, como los virus que causan leucemia (HTLV-1), carecen de una secuencia transformante definida, y se diferencian de los retrovirus con oncogenes por no transformar células en cultivo, solo inducen neoplasias en animales, y por que el tiempo que requiere dicha inducción es mayor que en los otros retrovirus.

Otros investigadores intentaron determinar dentro de la célula, cual es la estructura blanco de las alteraciones causadas tanto por agentes virales como carcinógenos y mutágenos, a partir de la cual se desencadena el proceso transformante. Sospechando que dicha estructura era el ADN, en 1979 se extrajo el ADN de células transformadas con carcinógenos químicos, y se inyectó en las células de la línea celular NIH-3T3, que son fibroblastos de ratón no transformados. Las células NIH-3T3 se transformaron, quedando demostrado que el ADN alterado es en quien se desencadena la malignidad dentro de la célula, y que a su vez es capaz de transmitir los mecanismos transformantes (Smith y cols., 1979). Al aislar la

FIGURA 1
ESTRUCTURA DE UN RETROVIRUS



GENOMA RETROVIRAL



secuencia responsable de dicha malignidad, resultó ser un gen similar al gen transformante del virus de Sarcoma murino de Harvey.

La existencia de secuencias oncogénicas celulares homólogas a los oncogenes virales, fue un importante hallazgo que indicó la presencia en el genoma humano de secuencias homólogas a los oncogenes virales, y que más tarde se llamó acción transformante. En diversas clases de células humanas se buscó la presencia de oncogenes y se detectaron en una gran variedad de especies y de células, incluso en células normales. En el genoma humano el primer oncogene detectado fue un miembro de la familia ras.

Las secuencias oncogénicas celulares pueden o no estar participando en los procesos transformantes de una célula, generalmente están presentes, pero sin activarse cuando están inactivos se les llama proto-oncogenes, y cuando se activan, oncogenes. A su vez, para distinguir los oncogenes virales de los celulares se les nombran como v-onc y c-onc, respectivamente (por ejemplo, el oncogene src viral se denomina v-src, y al celular, c-src).

CARACTERÍSTICAS DE LOS ONCOGENES

Los proto-oncogenes se expresan normalmente en el organismo al menos en alguna etapa del ciclo vital, generalmente en la etapa embrionaria y en cantidades mínimas, apenas detectables. Se comportan de acuerdo a las leyes de Mendel, están muy poco relacionados entre sí, se distribuyen en diferentes cromosomas, y su expresión es de tipo dominante. Existen tanto en el genoma humano como en otros mamíferos, aves, en levaduras, *D. melanogaster* y *E. coli*, lo que indica que han sido altamente conservados a lo largo de la evolución. Los oncogenes celulares y los virales, aunque considerados homólogos, no son exactamente iguales; pueden presentar delgaciones, mutaciones, incorporación de secuencias virales, etc., pero en general son muy similares.

Mecanismos de Activación.

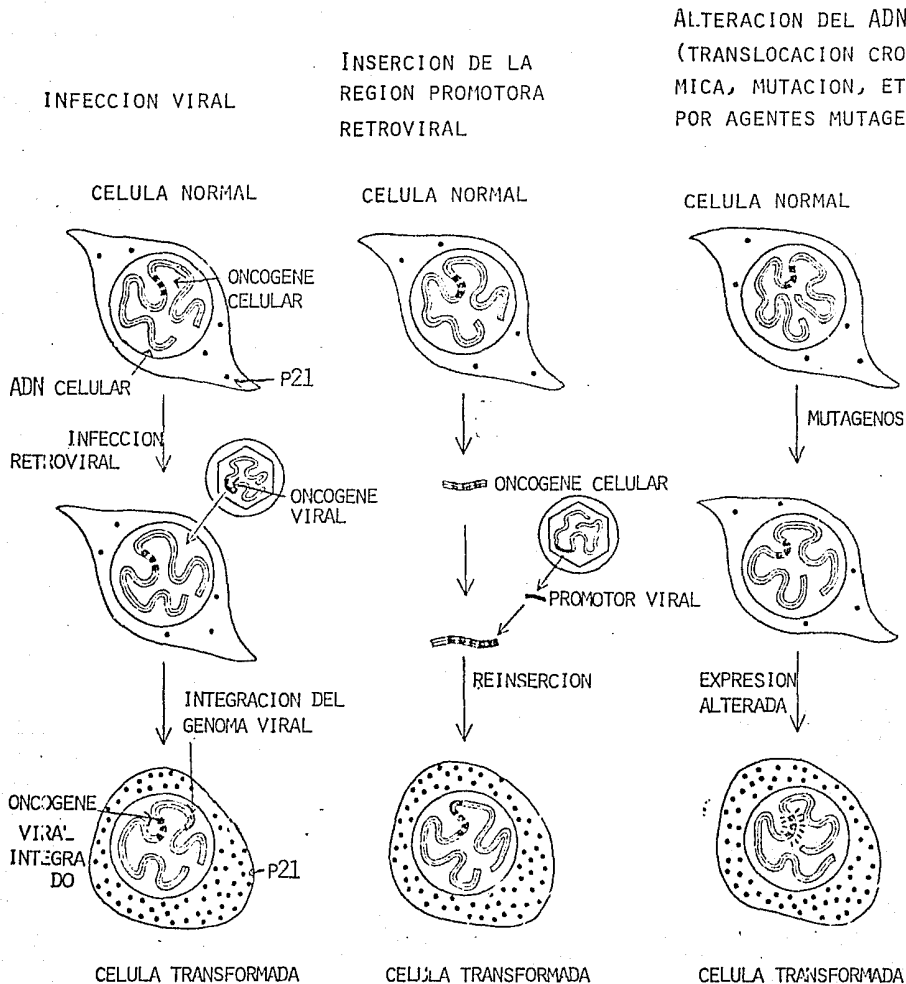
Un proceso transformante puede originarse básicamente por 2 causas: Por la acción de un virus tumorígeno, o por la activación de un proto-oncogene celular mediante la acción de un agente cancerígeno no viral, como son las radiaciones, o ciertas sustancias químicas. Entre las alteraciones más comunes están:

(1). Mutaciones puntuales. Se ha demostrado que ciertas mutaciones puntuales en el oncogene ras son responsables de su activación, lo cual se describirá a lo largo del texto.

(2). Inserción de promotores fuertes. Los retrovirus generalmente tienen una secuencia llamada LTR (Long Terminal Repeat), la cual actúa como un promotor fuerte (o región enhancer) que incrementa el nivel de transcripción; al insertarse un virus en la región cercana a un proto-oncogene, aumenta el nivel de su transcripción, lo que puede activarlo. Los LTR pueden activar un oncogene aun situados a cierta distancia, e independientemente de su dirección. (Neil y Forrest, 1987)

FIGURA 2

MECANISMOS DE ACTIVACION DE ONCOGENES



(7). **Translocaciones cromosómicas.** Se conocen varios casos de translocaciones relacionadas con la activación de oncogenes el más estudiado es el caso del linfoma de Burkitt, en cuyas células se ha establecido una translocación del cromosoma 8 al 14. En el cromosoma 8 se encuentra el proto-oncogeno *c-myc*, que al translocarse queda bajo el control de los promotores del gene de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, que está en el cromosoma 14 lo que aumenta el nivel de transcripción, y al aumentar se consigue que se active el oncogeno *c-myc* (Hamlyn y Kabbitts, 1983).

(8). **Amplificación genética.** De un gene normalmente existen dos copias e alíeles en el genoma de una célula; si existen más de dos copias, cada una de ellas puede transcribir, aumentando la expresión del gene, y si no existe un mecanismo celular regulatorio se incrementa la cantidad de proteína, con lo que quedaría activa de el oncogeno. Esto se ha observado en algunas líneas celulares establecidas y en muestras de tumores, en los que se han encontrado oncogenes amplificados como posible causa de la alteración oncogénica (Pulsenti y cols., 1985).

Proteínas Oncogénicas

Los oncogenes, como todos los genes, codifican proteínas, de las cuales, la más estudiada es la llamada *pp60-v-src*, codificada por el oncogeno *v-src*. Su peso molecular es de 60 Kd, y actúa en la fosforilación de proteínas, específicamente en la tirosina, y esta misma acción de sinasa la presentan otras proteínas oncogénicas. En general las proteínas oncogénicas pueden actuar a distintos niveles: como receptores transmembranales de factores de crecimiento que es el caso del receptor al factor de crecimiento epidérmico, que ha resultado ser prácticamente el mismo que la proteína codificada por el oncogeno *erb-B*; como proteínas citoplásmicas asociadas a membranas, que es el caso de la proteína *ras*, o bien, a nivel nuclear, como la proteína *myc*.

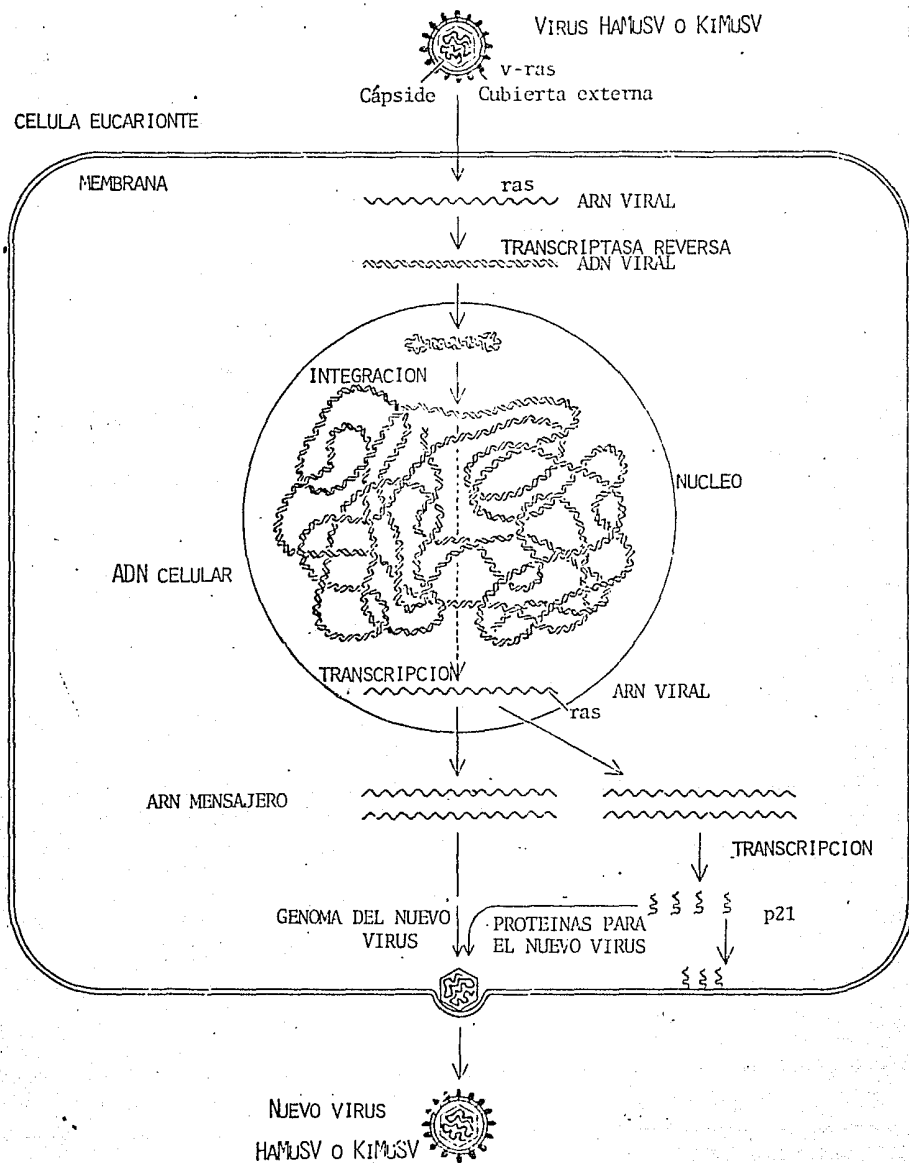
Respecto a los eventos bioquímicos resultantes de la activación oncogénica que intervienen en la transformación maligna, pueden mencionarse:

(1). **Fosforilación,** siendo las proteínas y fosfolípidos los sustratos potenciales. Las proteínas transformantes pueden participar en la fosforilación de ciertos sustratos.

(2). **Inicio de la síntesis de ADN.** La síntesis irrestricta de ADN es característica del fenotipo transformante. Algunas proteínas oncogénicas pueden participar, en forma directa o indirecta sobre los mecanismos que regulan dicha síntesis.

(3). **Regulación de la transcripción.** Las proteínas transformantes pueden influir en la transcripción de algunos genes celulares, ya sea estimulándola o inhibiéndola, interactuando con otras proteínas, o con promotores de la transcripción.

FIGURA 3
TRANSFORMACION MALIGNA POR INFECCION RETROVIRAL



(4). Transmision de mensajes intracelulares. Las proteínas oncogénicas, principalmente las de membrana, pueden intervenir en la transmision de mensajes del medio al interior de la célula u viceversa, actuando en forma análoga a los factores de crecimiento o a sus receptores.

Origen Y Evolucion de los Oncogenes

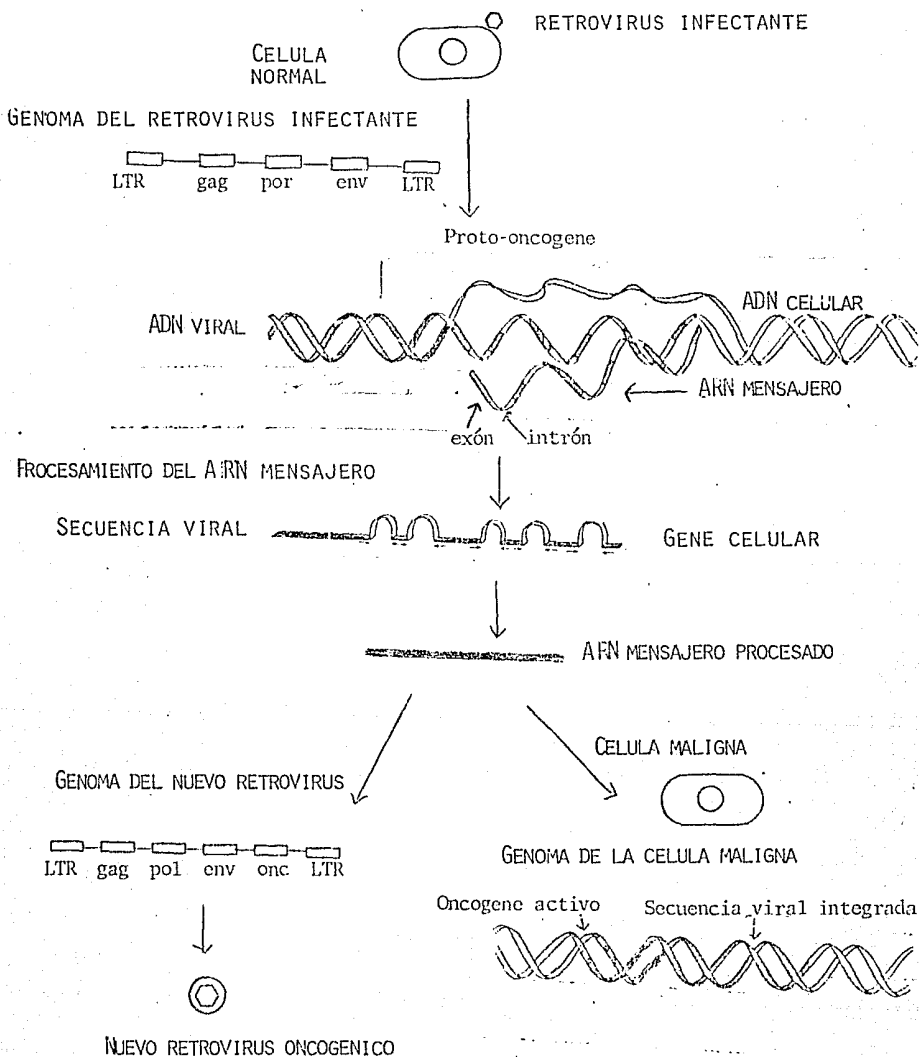
Hasta el momento, no se ha encontrado que los oncogenes confieran ninguna ventaja adaptativa particular a los virus que los presentan, pues la capacidad transformante no parece ser indispensable; la carencia de dicha capacidad al parecer no les afecta. La hipótesis más aceptada hasta el momento postula que los oncogenes virales tienen su origen en el genoma eucariote: Cuando un retrovirus penetra en una célula, actúa uno de los genes virales, el *gene pol*, que codifica la transcriptasa reversa, la cual transcribe un ADN tomando como patron al genoma de ARN. Este ADN así transcrito se integra al ADN celular y cuando ocurre la transcripción celular, el ARN que se transcribe en la región donde se localiza el ADN viral constituye de nuevo al genoma del virus pero generalmente este ARN recién transcrito incluye fragmentos con secuencias del genoma celular. Si el sitio donde se integró el ADN viral coincide o está cerca de un proto-oncogene entonces el fragmento de ARN de origen celular que es incorporado al genoma viral será precisamente el proto-oncogene o alguna parte de él, pasando a formar parte del virus. De esta manera se explica la existencia de oncogenes virales con tanta homología con los genes celulares (Neil y Sacrist, 1987).

Relacion entre Oncogenes y Factores de Crecimiento.

Existen varios oncogenes cuyo producto presenta gran homología con proteínas reguladoras del crecimiento o a sus receptores: El oncogene *erb-B*, homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (Downward y cols., 1984); el oncogene *sis* que es muy similar a una de las 2 subunidades del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-2/B) (Doolittle y cols., 1983); la proteína del oncogene *erb-A*, que presenta similitud tanto con el receptor de estrógeno como con el receptor de la hormona tiroidea (Sap y cols., 1986); la proteína del oncogene *fos* que es muy parecida al receptor del factor de estimulación de macrófagos, además de algunas otras proteínas oncogénicas análogas a factores de crecimiento o a sus receptores, como las proteínas de los oncogenes *c-myc*, *c-mjun*, *c-hst*, etc.

Todo esto indica que el estudio de los oncogenes eventualmente podría relacionarse con el estudio de los factores que regulan la proliferación de las células en condiciones normales.

FIGURA 4
ORIGEN DE LOS ONCOGENES RETROVIRALES



En cuanto a la manera como interactúan los oncogenes, se ha visto que existe un cierto grado de cooperatividad entre diferentes oncogenes, por ejemplo, entre *myc* y *ras* (ver Oncogeno *ras*). La carcinogénesis es un fenómeno complejo que involucra sucesivos pasos, aun muy poco conocidos. Se sabe, muy a grosso modo, que generalmente existe un periodo de iniciación del proceso transformante, y una segunda etapa de consolidación, y al menos un oncogene interviene en cada uno de estos pasos en los casos en que existe cooperatividad.

TABLA I

ONCOGENES: NOMBRE, ORIGEN, PROTEINA, FUNCION Y LOCALIZACION CROMOSOMICA EN EL GENOMA HUMANO

NOMBRE	ORIGEN	LOCALIZACION CELULAR	PROTEINA (Kd)	CROMOSOMA HUMANO	FUNCION (probable)
E1a	adenovirus	nucleo y citoplasma	26 y 36	--	Regular transcripcion
E1b	adenovirus	nucleo y citoplasma	21 y 55	--	Procesar y transportar algunos ARNm virales
T-Ag pequeño	polioma	citoplasma	22	--	Similar a factores de crecimiento
T-Ag mediano	polioma	membrana	56	--	Proteina-tirosina-cinasa
T-Ag grande	polioma	nucleo	100	--	Regular transcripcion. iniciar sintesis de ADN
T-Ag pequeño	SV40	citoplasma	12	--	Regular transcripcion. iniciar sintesis de ADN
T-Ag grande	SV40	membrana y nucleo	94	--	Regular transcripcion iniciar sintesis de ADN
abl	virus de leucemia Abelson	membrana	p210	9	Proteina-tirosina-cinasa
akt	virus de timoma humano	---	--	14	---
arg	humano	---	---	1	Proteina-cinasa
bcl-2	humano	---	p26	18	---
Blym	Pollo	---	p65	1	---
dbl	humano	membrana y citoplasma	p66	21	---
erb-A	virus de eritroblastosis de ave	nucleo	p75*	17	Analogo a receptores de hormona tiroidea y glucocorticoides
erb-B	virus de eritroblastosis de ave	membrana y golgi	p160	7	Analogo al receptor del factor de crecimiento epidermal
erg1	humano	---	p41	---	---
ets-1	virus de leucemia de ave E26	citoplasma	p54	11	---
ets-2	virus de sarcoma de ave E26	---	p56	21	---
fos	virus de sarcoma felino de Snyder	membrana	p92	15	Proteina-tirosina-cinasa
fgr	virus de sarcoma felino Gardner	membrana	p70**	1	Proteina-tirosina-cinasa
fms	virus de sarcoma felino	membrana	p170	5	Receptor del factor de estimulación de macrofaqos
fos	virus de osteosarcoma murino	nucleo	p55	2	Se une a ADN
fps	virus de sarcoma felino Fujinami	membrana	p98	15	Proteina-tirosina-cinasa
frr	humano	---	---	13	Proteina-tirosina-cinasa
fyn	humano	membrana	---	6	Proteina-tirosina-cinasa
gli	humano	---	p118	12	---
hck	humano	membrana	p57	20	Proteina-tirosina-cinasa

hst	humano		p22	11	Analogo a factores de crecimiento
int-1	raton	membrana	p41	12	---
jun	virus de sarcoma de ave 17	nucleo	p65*	1	Analogo al factor humano de transcripcion AP-1
kit	virus de sarc de Hardy Zuckerman	membrana	p110	4	Receptor de factor de crecimiento
lck	raton	membrana	pp56	1	Proteina-tirosina-cinasa
lyn	humano		p58	8	Proteina-tirosina-cinasa
mas	humano	membrana	--	6	Receptor a angiotensina
met	humano	membrana	p140	7	Proteina-tirosina-cinasa
mil	virus de ave H12	citoplasma	p100*	3	Proteina-serina/treonina cinasa
R-mil	pollo	--	p41		Proteina-serina-treonina cinasa
mos	virus de sarcoma de Moloney	citoplasma	p37	8	Proteina-serina/treonina cinasa
myc	virus de micoci tomatosis de ave	nucleo	p58	8	Se une a ADN
N-myc	humano	nucleo	p64	2	
L-myc	humano	nucleo		1	
myb	rata	nucleo	p45	6	Se une a ADN
neu	rata	membrana	p185	17	Proteina-tirosina-cinasa
p53	humano	nucleo	p53	11	Se une a ADN
pim	raton	citoplasma	p36	6	Proteina-cinasa
raf-1	virus de sarcoma murino 3411	citoplasma	p75 y p90*	3	Proteina-serina/treonina cinasa
raf-2	virus de sarcoma	citoplasma		7	Proteina-tirosina-cinasa
Ha-ras	virus de Harvey	membrana	p21	11	GTPasa, se une a GTP/GDP
Ki-ras	virus de Kirsten	membrana	p21	12	GTPasa, se une a GTP/GDP
N-ras	humano	membrana	p21	1	GTPasa, se une a GTP/GDP
rel	virus de reticulo endoteliosis aviar	citoplasma	p57	2	Proteina-serina-cinasa
ret	humano	membrana			Proteina-tirosina-cinasa
ros	virus de sarcoma de ave UR2	membrana	p68*	6	Proteina-tirosina-cinasa
sic	virus de sarcoma de mono	citoplasma	p28	22	Analogo a la subunidad 2 del factor de crecimiento derivado de plaquetas
sea	virus de eritroblastosis			11	Proteina-tirosina-cinasa
ski	virus de Sloan-Kettering de ave	nucleo		1	
src	virus de sarcoma de Rous	membrana	p60	20	Proteina-tirosina-cinasa
tkc	murino		p56		Proteina-tirosina-cinasa
trk	humano	membrana	p70		Proteina-tirosina-cinasa
yes	virus de sarcoma	membrana	p62	18	Proteina-tirosina-cinasa

* producto asociado al gene gag viral

** producto asociado al gene gag viral y al gene de actina celular

datos obtenidos del Archivo General de Oncogenes

ONCOGENES RAS

Uno de los oncogenes más importantes de los conocidos hasta el momento es el oncogeno ras. Las razones para considerarlo tan importante, y por lo que fue elegido como tema del presente texto son las siguientes:

(1). Los genes ras fueron los primeros oncogenes detectados en el genoma humano.

(2). Los genes ras fueron los primeros cuya tumorigenicidad se comprobó en experimentos directos y reproducibles, lo que fue la primera evidencia de una alteración genética causante de un desarrollo neoplásico, y contribuyó a consolidar la reciente teoría de la existencia de genes causantes de cáncer.

(3). Los mecanismos de activación de los genes ras son de los más sencillos que se han descrito en los oncogenes: Una simple mutación puntual determina la diferencia entre el oncogene y el proto-oncogene, lo que permite establecer modelos muy accesibles para el estudio de los procesos que intervienen en la transformación celular.

(4). Existe toda una familia de genes ras cuyos principales elementos, los virales y 3 de mamíferos son:

v-Ha-ras
v-Ma-ras
c-Ki-ras
v-Ki-ras
M-ras

Sin embargo, existen varios otros genes de esta familia:

RAS1 y RAS2 (*S. cerevisiae*)
Dras1, Dras2 y Dras3 (*Drosophila* sp.)

Otros genes relacionados con la familia ras, son:

YPT (*S. cerevisiae*)
rho (*Halobacterium salinarum*)
ora (*Escherichia coli*)
ral (*rat*)
R-ras (humano)

(5). El principal criterio para agrupar todos estos genes en una sola familia es la proteína codificada por ellos: Las proteínas virales y las celulares son muy homologas, tanto en su función como en su estructura, y con las regiones de mayor conservación y las de divergencia, coinciden entre sí. Se denomina a la proteína ras como p21, porque el peso molecular de las proteínas celulares y virales es de 21,000 daltones.

(6). La proteína ras se encuentra en especies tan distantes evolutivamente como los humanos y las bacterias; la homología tan grande que guarda entre sí indica que se han conservado mucho durante la evolución.

(7). Una proteína que se ha conservado tanto a lo largo de millones de años debe tener una función muy importante para la maquinaria y la fisiología celular; sin embargo esta importante función hasta el momento no se ha logrado determinar. Cuando se logre conocerla, seguramente será un trascendental avance en el estudio de la biología molecular y celular.

(8). Los oncogenes ras se han encontrado activos en neoplasias humanas con una alta frecuencia y en todo tipo de neoplasias lo que indica que no están asociados a ningún tipo de tejido o tumor en especial.

(9). Los proto-oncogenes ras se encuentran en todos los tejidos humanos, expresándose en mayor o menor proporción, y al parecer intervienen en la etapa embrionaria del desarrollo humano.

(10). Las proteínas RAS de *S. cerevisiae* se han estudiado en forma exhaustiva, dadas las facilidades de manipulación que permiten las levaduras, y se han obtenido hallazgos muy interesantes; en particular el que las proteínas ras humanas, con ciertas modificaciones constituyen a sus homólogas en levaduras, y que las proteínas RAS de levaduras, también modificadas, logren transformar células de mamíferos con particularidades que hasta ahora solo se han encontrado en el caso de los oncogenes ras y que permiten una amplia gama de posibilidades de estudio, principalmente respecto a la función de las proteínas codificadas por los proto-oncogenes ras en las células normales, que es de las áreas más interesantes donde el estudio de los oncogenes ras puede aportar la mayor y la más valiosa información.

INTRODUCCION A LOS ONCOGENES RAS

Los oncogenes celulares de la familia ras son versiones activadas de los proto-oncogenes c-Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras. De los oncogenes descritos hasta el momento, los oncogenes ras estan entre los mas frecuentemente asociados a tumores humanos, pues han sido encontrados aproximadamente en 20% de los tumores humanos re portados (Yuasa y cols., 1984). Ademas como se encuentran activos en una gran variedad de tumores no se les puede considerar asociadas a un tipo especial de tejido o de neoplasia.

Los genes ras se detectaron por primera vez en los virus de carcinoma murino de Harvey y Kirsten. Ambos oncogenes, denominados v-Ha-ras y v-Ki-ras respectivamente, se clonaron y con su ADN se hicieron "sondas" (fragmentos de ADN de cadena sencilla que cuando se hibridan con los diversos fragmentos resultantes de la digestion del ADN en estudio, con enzimas de restriccion, localizan y se unen a los fragmentos que tengan una secuencia complementaria). Dichas sondas, en presencia del genoma de diversos organismos, como ratones, aves y humanos, detectaron 2 secuencias que se denominaron genes c-Ha-ras y c-Ki-ras (Lilic y cols., 1981). Asi los genes c-Ha-ras y c-Ki-ras se encontraron en celulas humanas, tanto tumorales como normales. Cuando el ADN de celulas normales y malignas fue transfectedo en celulas NIH-3T3, se detecto que en el ADN de una linea tumoral humana la linea EJ de tumor de vejiga existia un fragmento inserto en las celulas NIH-3T3 normales. Este fragmento resulto contener al gene humano homologo del oncogene viral v-Ha-ras. Con el fragmento detectado se obtuvo la primera sonda de un oncogene celular humano (Morada y cols., 1982) que se utilizo para identificar los oncogenes c-Ha-ras y c-Ki-ras humanos en las lineas celulares de carcinoma de vejiga y pulmon respectivamente (Ber y cols., 1982).

Desde entonces se han seguido aprovechando las ventajas de la linea celular NIH-3T3, que tiene la capacidad de expresar los oncogenes ras activos en celulas tumorales humanas; las celulas NIH-3T3 que expresan oncogenes ras se transforman, y son facilmente distinguibles por su fenotipo caracteristico, diferente del fenotipo de los fibroblastos normales, y ademas presentan un crecimiento distinto de las celulas normales, que crecen en monocapa. Cuando en una caja petri se mantienen celulas NIH-3T3 transfectadas con ADN que incluye un oncogene ras, se observa la formacion de focos de celulas transformadas, que son las que expresan al oncogene. Esta tecnica para detectar oncogenes ras en el genoma de algun organismo o tipo celular, se conoce como "ensayo de transformacion en celulas NIH-3T3" y es de las tecnicas mas empleadas para detectar oncogenes ras activos.

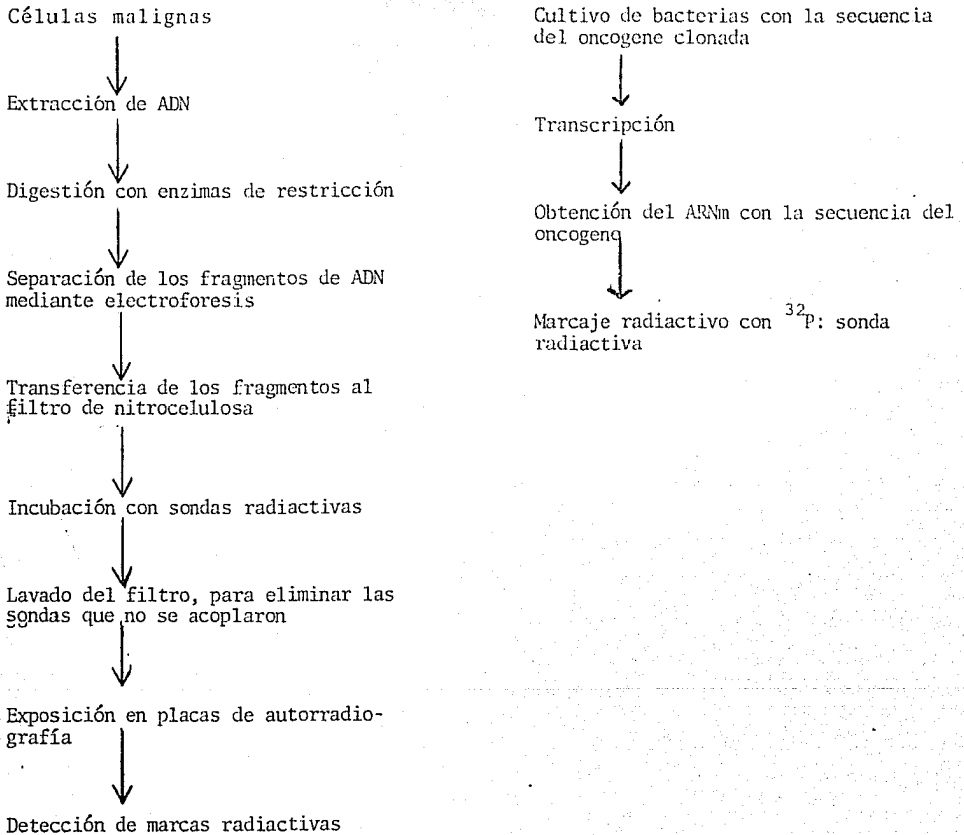
En la linea celular EJ se encontro que los fragmentos detectados con la sonda radiactiva c-Ha-ras eran practicamente iguales a los que se obtenian en celulas normales por lo que el numero de clones del gene en el genoma de las celulas tumorales debia ser el mismo que en las normales indicando que la diferencia en el numero de clones no podia considerarse como un factor activante, al menos en este caso. La diferencia entre el proto-oncogene, y el oncogene que pudiera considerarse como el factor de activacion no

era muy evidente pero al secuenciar ambos genes se detectó una muy sutil puntual en el codón 12. El proto-oncogene codifica glicina en esta posición, y el oncogene codifica valina. Posteriormente se comprobó en forma directa que la mutación en el codón 12 es el mecanismo responsable de la capacidad oncogénica de p21 al clonar el proto-oncogene y el oncogene, y transfectando ambos en células NIH-3T3. El proto-oncogene no indujo ninguna transformación, pero al transfectar al oncogene, sí aparecieron focos de células transformadas (Taparowsky y cols., 1982). Los genes ras fueron precisamente los primeros oncogenes cuya tumorigenicidad se estudió de manera directa y reproducible.

Se estudió el ADN de una gran cantidad y variedad de tumores tanto humanos y no humanos, y mediante ensayos de transfección en células NIH-3T3 se detectaron oncogenes ras en diversos tipos de tumores. Sin embargo en un principio solo se conocía la mutación puntual en el codón 12 como la alteración que activaba ras, hasta que se reportó otra mutación puntual capaz de conferir capacidad transformante: La mutación en el codón 61 (Yuasa y cols., 1983). En las muestras de tumores in vivo solo se ha reportado otra mutación puntual que confiere tumorigenicidad a ras, la mutación del codón 13 (Ros y cols., 1985). En los siguientes capítulos se amplía más la información al respecto.

FIGURA 5

DETECCION DE ONCOGENES MEDIANTE SONDAS RADIOACTIVAS



La sonda radiactiva es una secuencia de ARN, complementaria de la secuencia del oncogene que se estudia; si detecta y se une a su secuencia complementaria, no es retirada al lavar el filtro, y emitirá una señal radiactiva que será detectada en las placas de autorradiografía, indicando la presencia en las células malignas, de un oncogene activo.

MUNIG, J. 1973. The chromosomal basis of human neoplasia. *Colloq. Sci.* 227-238.

El continuo perfeccionamiento de las técnicas de bandeo cromosómico ha permitido estudiar en detalle las células neoplásicas que en su mayoría presentan aberraciones cromosómicas. Las aberraciones más comunes reportadas son: Delección de bandas específicas, translocación recíproca entre 2 cromosomas, uno que no cambia, pero se rompe en un sitio (cromosoma constante o donador), y otro que varía (cromosoma receptor); también son comunes las trisomías. En linfoma de Burkitt se ha reportado la translocación del cromosoma 8 al 14 [t(8;14)] en el 100% de los casos estudiados, se ha detectado una t(7;22) en el 95% de leucemias mielógenas, monosomía del cromosoma 22 en 75% de meningiomas, delección de las bandas 31 a 36 (1p31p36) del brazo corto del cromosoma 1 en 11 de 14 neuroblastomas, y una t(6;14) en 26 de 26 carcinomas de ovarios, entre otros. En los cariotipos de 240 pacientes con leucemias, linfomas y carcinomas, 78% presentaron diferentes aberraciones: se detectó t(7;22) en 24 de 24 leucemias no linfocíticas tipo M3 (fase de desarrollo neoplásico); delección del brazo largo del cromosoma 5, o 7, o ambos en 11 de 24 leucemias no linfocíticas M2; in versión del cromosoma 16 en 5 de 5 leucemias mielomonocíticas; la translocación del cromosoma 11 al 8, 9, 10 o 17 en 6 de 11 leucemias monocíticas M5 o M4; t(9;22) o t(4;11) en 5 de 7 leucemias linfocíticas; delección del brazo corto del cromosoma 1 en 4 de 5 neuroblastomas; delección del brazo corto del cromosoma 3 en 4 de 4 carcinomas pulmonares y delección del brazo largo del cromosoma 13 en 3 de 5 retinoblastomas. Estas aberraciones pueden estar relacionadas con las alteraciones que activan los oncogenes.

BRUCE, J. G. y BRIDSON, R. L. 1977. Identification of a transformation-specific antigen induced by an avian sarcoma virus. *Nature* 267:393-395.

Los virus de sarcoma de ave tienen la capacidad de inducir tumores en aves. El mecanismo que permite que estos virus puedan transformar se desconoce pero se considera que existe un gene responsable de conferir tal capacidad codificando una proteina involucrada al menos en alguno de los procesos transformantes; dicho gene se ha llamado "src" (por sarcoma). Para caracterizar este gene y tratar de identificar su producto, se transformaron celulas de pollo con el virus de sarcoma de ave (ASV), y se indujeron tumores en hamsters con el mismo virus. Se infectaron conejos con el ASV, se desarrollaron tumores, y se extrajo suero que se analizo, y se encontraron anticuerpos contra el producto del gene src. Se hicieron extractos de las celulas transformadas, de pollo y de hamster, asi como de celulas normales, se inmunoprecipitaron con el suero de conejo y con anticuerpos especificos contra proteinas virales. En las celulas transformadas, el suero de conejo identifico una proteina con un peso molecular de 60 Kd, que no detectaron los anticuerpos contra proteinas virales ni se encontro en celulas normales, ni en celulas transformadas con otros virus. Se infectaron celulas con un virus mutante cuya oncogenicidad depende de la temperatura (CA-ASV): A temperatura ambiente el virus es transformante, pero a 41 C no lo es. Se cultivaron celulas infeg todas con el virus CA-ASV a temperatura ambiente transformadas, y en ellas se detecto la proteina de 60 Kd, pero en celulas cultivadas a 41 C, no transformadas, la proteina se detecto con mucho menos intensidad, aun cuando si se inmunoprecipitaron proteinas estructurales virales con igual intensidad en ambos tipos celulares indicando que la falta de la capacidad transformante no se debe a alteraciones estructurales del virus, sino a la inactivacion especifica de la proteina responsable de la transformacion. La proteina de 60 Kd puede considerarse el producto del gene src.

SMITH, C., SHILO, R. T., GOLDBERG, M. C., BOWENBERG, A., and Spiegel, R. A. (1979). Passage of phenotypes of phenotypically transformed cells via infection of DNA and detergent. *Proc Natl Acad Sci* 76:5719-19

Los mutágenos y carcinógenos químicos y virales transforman células *in vitro*, indicando que el blanco de sus acciones es el ADN, pero no se ha demostrado directamente que el ADN sea este blanco. Se estableció una prueba directa para estudiar la capacidad transformante del fenotipo mutigeno de célula a célula via ADN purificado para intentar demostrar la existencia de genes capaces de generar una carcinogénesis. Se transformaron células de ratón y rata con carcinógenos químicos *in vivo* o *in vitro* y se establecieron 15 líneas celulares se extrajo el ADN de estas líneas y se inyectó en fibroblastos de ratón no transformados, la llamada línea NIH-3T3. El ADN de 5 de las líneas estudiadas indujo transformación en las células NIH-3T3 y los otros 10 transformaron muy pocas, o ninguna célula. Así se demostró que en el fenotipo quimicamente transformado ocurre un cambio en el ADN que se establece ahí, al grado de conservar la capacidad transformante después de extraerlo de la célula original o introducirlo en otra. En células transfectadas, el ADN externo que logra insertarse y transcribir generalmente es solo una parte, y es poco probable que en una misma célula se logren insertar y transcribir varios fragmentos que deban requerirse para transformarse, lo que sugiere que la secuencia transformante este incluida en un solo gen. Se concluye que en el genoma humano existen secuencias genéticas con capacidad para inducir una transformación maligna.

NEIL, J. D. y FORREST, D 1987. Mechanisms of retrovirus-induced leukemias. Selected aspects. Biochem Biophys Acta 907:71-91.

Los mecanismos por los cuales los virus de leucemia inducen transformación en las células, pueden ser:

- 1) Transducción, al integrarse al genoma viral un proto-oncogene celular.
- 2) Inserción de promotoras virales (LTR), que alteren la expresión de un proto-oncogene celular.
- 3) Producción de una señal mitogénica aberrante por un gene normalmente involucrado en la replicación viral en la célula infectada.
- 4) Unión de algún receptor inmunológico viral, presente en la superficie celular, a su antígeno, aumentando la proliferación celular.

Los mecanismos indirectos incluyen alguna infección viral que pueda causar inmunosupresión o liberación de factores de crecimiento propiciando la proliferación de células que previamente fueron transformadas por otros agentes, o bien, que estimule la producción de linfocitos, aumentando la probabilidad de que en alguna célula ocurran mutaciones que resulten en una tumoración. De estos mecanismos, los más estudiados son:

Transducción. Un virus con genoma de ARN transcribe a ADN mediante la acción de la enzima transcriptasa reversa, codificada por el gen pol del propio virus; este ADN sintetizado se integra al genoma celular. Cuando ocurre la transcripción en la célula, al transcribirse la zona donde se integro el virus el ARNm constituirá nuevamente al genoma viral, pero también pueden quedar incluidos fragmentos de secuencias celulares cercanas. Si en este fragmento se encuentra un proto oncogene celular, su secuencia pasará a formar parte del genoma viral, y cuando el virus repita el ciclo e infecta otra célula, tendrá un gene viral transformante.

Otro mecanismo muy estudiado es la inserción de alguna secuencia viral de las llamadas LTR (Long Terminal Repeat), una secuencia de las conocidas como enhancers o aumentadoras, que aumentan el nivel de transcripción de los genes cercanos en ambos sentidos, o incluso de genes no localizados en los sitios más cercanos al LTR pues su radio de acción comprende una cierta distancia. Cuando un retrovirus transcribe su genoma de ARN a ADN y lo inserta en el genoma celular, el ADN viral incluye los LTR cuyo efecto altera también a los genes celulares, y si alguno de ellos es un proto-oncogene al aumentar su transcripción, puede activarse.

HOMULYN, P. H. y BURKITT, H. H. 1983. Translocation joins c-myc and immunoglobulin gamma 1 genes in a Burkitt lymphoma revealing a third exon in the c-myc oncogene. *Nature* 304:135-139.

El linfoma de Burkitt se caracteriza porque sus células presentan una alta incidencia de translocaciones específicas que alteran una parte del cromosoma 8, la región 8q24-qter. Esta translocación generalmente involucra la región 14q32 del cromosoma 14, y con menor frecuencia al cromosoma 2 (2p12), y al cromosoma 22 (22q11). En la región 14q32 se localiza el gene de la cadena pesada H de las inmunoglobulinas, en la región 2p12, el gene de la cadena ligera kappa (L), y en la 22q11, el gene de la cadena ligera lambda. Se estudió la línea celular Raji de linfoma de Burkitt y se encontró que el gene c-myc está translocado en la zona adyacente al gene de la región constante de la cadena pesada H de las inmunoglobulinas. Los genes translocados están en dirección contraria a la dirección de la transcripción. Se detectaron 2 ARNm diferentes, uno similar al del proto-oncogene c-myc típico de células normales, y otro de tamaño menor, que solo se expresa en células de linfoma de Burkitt. Al analizar los 2 ARNm se determinó que myc está formado por 3 exones. El primer exon se transcribe, pero no se traduce en la proteína, formada solo por los exones segundo y tercero; al translocarse c-myc se pierde el primer exon, sin embargo el nivel del ARNm de c-myc es mayor en las células malignas en comparación con las normales. Esto indica que la translocación de c-myc a la región adyacente al gene de la región constante de la cadena pesada H de las inmunoglobulinas, altera su nivel de transcripción, y se puede considerar como el mecanismo responsable de la activación de c-myc en linfoma de Burkitt.

BUCICANI, S., GANTZCO, H., LEWIS, L. K., SURRENTINO, V. y BARBACID, M. 1995. ras gene amplification and malignant transformation. Mol Cell Biol 15:2034-2041.

La amplificación de un proto-oncogene se considera un mecanismo que lo activa en oncogene aunque se ignora como ocurre esto. Se investigó si para la activación, es suficiente con que existan múltiples copias del proto-oncogene c-Ha-ras humano sin otra alteración se transfirieron unas células NIH-3T3 con plásmidos con la secuencia del proto-oncogene c-Ha-ras humano otras con fragmentos con el proto-oncogene c-Ha-ras solo y otras con plásmidos control sin c-Ha-ras. Al transfectar 15-30 microgramos tanto de plásmidos como de fragmentos las células se transformaron, pero con 5 mg. o menos, no hubo transformación. Se detectaron entre 30-100 copias de c-Ha-ras por célula transformada, indicando que la transformación se debió al gran número de copias del proto-oncogene. Las células NIH-3T3 transformadas, se inyectaron en ratones que desarrollaron tumores y murieron. En las NIH-3T3 transformadas los niveles de ARNm de c-Ha-ras y de la proteína p21 fueron mucho mayores que en las células control; tanto en el ARNm como en p21 el aumento fue proporcional al número de copias del proto-oncogene en el genoma de las NIH-3T3 transformadas. Se estudió la amplificación del proto-oncogene c-Ha-ras en humanos, analizando 75 muestras de tumores de pulmón, colon, recto y vejiga así como de 13 preneoplasias de colon, y 36 muestras de linfocitos normales, y únicamente en un tumor pulmonar se detectó c-Ha-ras amplificado 50-60 veces. Se concluye que un número de copias del proto-oncogene c-Ha-ras, mayor al normal, es un mecanismo que activa su oncogenicidad, causando transformación celular, induciendo neoplasias en animales y posiblemente también en humanos, pues la amplificación de ras ocurre en neoplasias humanas aunque parece que no se presenta con mucha frecuencia.

DONNARD, J., YARDEN, Y., MAYES, E., SCACE, G., TOTTY, N., STODINELL, P., ULLRICH, A., SCHLESSINGER, J. y WATERFIELD, M. D. 1984. Cloning, isolation, of epidermal growth factor receptor and v-erbB oncogene protein sequences. Nature 307:521-526.

Los factores de crecimiento son proteínas mitogénicas que inducen la síntesis de ADN y la proliferación de células específicas en cultivo. Se ha reportado que el factor de crecimiento epidermal (EGF) parece influir en la proliferación y diferenciación celular su receptor es característica por que posee los residuos de tirosina, actividad que comparte con proteínas oncogénicas como src Se analiza la secuencia de aminoácidos del receptor de crecimiento epidermal, y se determina que presenta una gran homología con el producto del oncogene viral v-erbB. El receptor del factor de crecimiento epidermal es una glicoproteína cuyo peso molecular es de 175 Kd; la proteína simple pesa 138 Kd, mientras que el producto del oncogene viral v-erbB pesa 66 Kd aproximadamente e incluye la región transmembranal y el dominio donde se localiza la actividad de tirosina cinasa, pero carece de la región localizada hacia la superficie de la célula. Probablemente el virus de eritroblastosis de ave, que presenta al oncogene v-erbB, tiene incorporado en su genoma solo una parte del gene del receptor al factor de crecimiento epidermal del genoma de ave donde ocurrió la inserción.

DOOLITTLE, R. F., HUMMSPILLER, M. W., HOOD, L. E., DEVARE, S. G., ROBBINS, K. D., ANDERSON, B. H. y ANTONIADES, H. N. 1983. Simian sarcoma virus onc gene v-src, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science 221:275-277.

La secuencia transformante del virus de sarcoma de simio, el oncogene v-src, codifica una proteína de 28 Kd, llamada p28-sis. Por otro lado, el factor derivado de plaquetas (PDGF), es una proteína catiónica, estable a diferentes temperaturas que circula en la sangre normalmente en los granulocitos alfa de las plaquetas se libera en el suero durante la coagulación de la sangre y es un mito gene fuerte; consta de dos péptidos homólogos, PDGF1 y PDGF2. Al comparar las secuencias de aminoácidos del PDGF, y de la proteína p28-sis se encuentra una estrecha homología, principalmente con el péptido PDGF2. Al parecer el virus de sarcoma de simio tiene en su genoma al menos un fragmento del gene que codifica el PDGF que pudo haber adquirido al introducirse en el genoma de simio, e insertarse en un sitio que resulto encontrarse cercano al locus del gene del PDGF, de tal manera que al ocurrir la transcripción, las copias de los virus recién sintetizados, llevaban incorporada la secuencia del gene del PDGF eucariote, que en los virus manifiesta una actividad transformante.

GAP, J., MUNOZ, A., BARN, R., GOLDBERG, Y., GHYSDAEL, J., LEUTZ, C., FENG, H. y WINSTON, B. 1985. The c-erbA protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature* 324:635-640.

El gen *erb-A* no es oncogénico por sí mismo, pero aumenta la tumorigenicidad de otros oncogenes, como el *erb-B*. En las células *erb-A* afecta los sistemas de transporte iónico y los factores reguladores de la diferenciación. La secuencia del producto de *erb-A* muestra homología con proteínas que actúan como receptores de hormonas. Para estudiar esta homología, se secuenció tanto el ADN como la proteína de *erb-A*, que pesa 46 kD, se estudiaron los datos de los receptores hormonales conocidos para encontrar algún receptor con ese peso. El peso del receptor de la hormona tiroidea (T3) resultó coincidir con el buscado, y por ello se le analizó; el receptor de la hormona tiroidea tiene afinidad tanto por la T3 como por la hormona T4, ambas localizadas en el núcleo. Se puede considerar que la proteína del oncogene *erb-A* es homólogo al receptor de la hormona tiroidea.

MURO, Y., SNA, A., KRUG, M. H., SRIVASTAVA, S. K., NEEDLEMAN, S. W., PIERCE, J. H., RHIN, J. S., GUL, K., REDDY, E. P., TRONICK, S. R. y AARONSON, G. A. 1984. Regulated oncogenes of human tumors. *Cancer Cells* 2:433-439.

La técnica de transfección de ADN de células tumorales en células NIH-3T3, ha permitido identificar oncogenes miembros de la familia *ras* en muestras de muy diversos tipos tumorales. Tanto líneas celulares como tumores primarios han resultado tener oncogenes *ras*, y su presencia se ha verificado mediante otras técnicas, como la de Southern (mediante sondas de ADN). Se aisló ADN de 10 tumores y 12 líneas celulares, detectándose genes *ras* en 5 tumores y 2 líneas, en los que se encontraron alterados tanto el c-Ha-*ras* como el K-Ra-*ras*, y aun el recientemente descrito N-*ras* (en neoplasias hematopoyéticas, como leucemias y linfomas, es el más frecuentemente alterado de los 3). Las mutaciones activantes encontradas fueron del codón 12 y del 61. Se estableció que las alteraciones en oncogenes *ras* no son artefactos debidos a la manipulación y que, de acuerdo con nuestros datos y los reportados en la bibliografía, la frecuencia de activación de genes *ras* en neoplasias humanas es aproximadamente de 10-20%.

ELIJS, G. W., DEBEO, D., SHIN, Y. Y., BONDY, H. A., YOUNG, H. A., TOUCHINO, N., LOFF, D. R., SOBELNICK, E. M. 1981. The p21 src gene of Harvey and Kirsten sarcoma viruses originate from divergent members of a family of normal vertebrate genes. *Nature* 292:504-511.

Los virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten (HaMuSV y KiMuSV) poseen una secuencia oncogénica que codifica una proteína con un peso molecular de 21 Kd, llamada p21. Se analizaron ambos virus, y se determinó que la secuencia oncogénica se localiza hacia el extremo 5' del genoma de ambos. Se visualizaron al microscopio electrónico las dos secuencias y se observaron 2 fragmentos de poca homología entre otros 3 de homología casi total entre ambas regiones donde se localizan las secuencias transformantes. Se aislaron las secuencias del resto del genoma viral, y se hicieron sondas con las dnas. La sonda con la secuencia transformante del HaMuSV se empleó para estudiar el genoma de células transformadas con el Ki-MuSV detectándose un fragmento distinto ausente también en células control así se confirmó la especificidad de las sondas. Ambas sondas se utilizaron para estudiar el ADN de células de ratón, ratón, pollo y humano; la sonda de Ha-MuSV detectó 1 o 2 fragmentos de cada caso, y la sonda de Ki-MuSV detectó de 1 a 3 fragmentos. Los fragmentos detectados con cada sonda son diferentes. Estos resultados indican que los oncogenes de los virus Ha-MuSV y Ki-MuSV no pueden provenir de un solo gen, que adquirió variaciones al incorporarse en cada virus; en realidad lo que al parecer ocurrió es que cada virus incorporó un gen distinto, de los 2 genes presentes en el genoma progenitor, que aunque son muy similares, son dos genes diferentes.

SORADA, L. F., TABIN, C. J., SHIH, C. y WEINBERG, R. A. 1982. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene. *Nature* 297:474-478.

Se han descrito dos grupos de oncogenes: El primero consiste en los oncogenes que se han encontrado por su asociación con oncogenes retrovirales, y el segundo son los genes detectados mediante ensayos de transfección de ADN tumoral de mamífero, en células que se transforman por efecto de los oncogenes expresados en las células tumorales. Para saber si en ambos grupos existen oncogenes comunes, se hicieron sondas con el ADN de 7 oncogenes del primer grupo, para estudiar células NIH-3T3 transfectadas con 7 oncogenes del segundo grupo. Se analizaron los fragmentos de ADN de las NIH-3T3 cortando con la enzima EcoRI tanto de las células sin transfectar como de las transfectadas con los 7 oncogenes del segundo grupo y solo en las células transfectadas con ADN de la línea celular EJ de vejiga humana, al hibridar con la sonda del oncogene *c-Ha-ras* de genoma de ratón, se detectó un fragmento de 75,000 pares de bases, ausente en el resto de las células. Al digerir con BamHI se encontró un fragmento de 6.6 Kb, con el oncogene *c-Ha-ras* humano, con el que se elaboró una sonda para analizar ADN humano normal, y se detectó el mismo fragmento que con la sonda de ratón. Esta nueva sonda de origen humano detectó el mismo fragmento que la sonda original en las NIH-3T3 transfectadas. Se analizó el ARN de las células EJ y las células transfectadas, y se encontraron transcritos de 1.2 y 0.1 Kb, ausentes en las células control. Se concluye que el oncogene del genoma de la línea celular EJ es homólogo al del oncogene del genoma de ratón, y por lo tanto, también al del virus de sarcoma murino de Harvey. Este es el primer oncogene de origen humano caracterizado.

OSB, C. J., KROEMERIE, T. G. y LUDFEL, G. M. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. Proc Natl Acad Sci USA 79:3637-3640.

En el genoma humano existen secuencias capaces de inducir *tu* *in vivo* y de transformar células en cultivo. Para estudiar dichas secuencias, se extrajo el ADN de dos líneas celulares tumorales humanas, una de vejiga y una de pulmón, se transfirió dicho ADN en células NIH-3T3 que se transformaron, y en su genoma se detectaron fragmentos de origen humano. Con las sondas de los once genes virales v-Ha-ras y v-Ki-ras se analizaron los fragmentos humanos que resultaron ser homologos, indicando que las secuencias humanas responsables de la transformación de las células NIH-3T3 son genes homologos a los oncogenes ras virales. Se encontro que los niveles de la proteína p21 en las líneas celulares, y en las células NIH-3T3 son de 2-4 veces más altas que en las NIH-3T3 sin transformar lo que comprueba que los oncogenes celulares c-Ha-ras y c-Ki-ras intervienen directamente en la transformación.

TAPAROSKY, E., GUARD, Y., PASANO, G., SHIMIZU, K., GOLDFARB, O. y WIGLER, M. 1982. Activation of the T24 bladder carcinoma transforming gene is linked to a single amino acid change. Nature 299:742-746

Se ha reportado la existencia de un gene homologo al oncogene viral v-Ha-ras en la línea T24 de un carcinoma de vejiga humana, capaz de transformar células NIH-3T3. Para eliminar la posibilidad de que la activación oncogénica causante de la transformación de las NIH-3T3 se haya alterado en el curso de la transfección se determinó con precisión el mecanismo responsable de dicha activación. Se eligió el ADN de las células T24, y de células de placenta humana, y los fragmentos se clonaron por separado en fagos lambda formando un conjunto o biblioteca genómica. Se aislaron los fragmentos que contienen la secuencia del gene c-Ha-ras, tanto del genoma de la línea T24 como en la de placenta, y se hicieron ensayos de transfección en células NIH-3T3. Los fragmentos de la línea T24 transformaron las células, pero los de placenta no. Se construyeron varios genes híbridos con secuencias de los genes de T24 y de placenta, hasta que se delimitó la región responsable de la activación, y al secuenciar dicha región se encontró una única diferencia: una mutación puntual en el codón 12. Se comprobó así que el gene c-Ha-ras mutado en el codón 12 es un oncogene activo.

YUCCA, Y., SRIVASTAVA, S. K., DUNN, C. Y., RHIM, J. S., REDDY, E. P. y CARONSON, D. A. 1988. Acquisition of transforming properties by alternative point mutations within c-bas/has human proto-oncogene. *Nature* 333:773-775.

Entre los oncogenes más estudiados se encuentran los pertenecientes a la llamada familia de oncogenes ras. Uno de ellos se encuentra en el genoma de rata, de donde se incorporó en el virus de sarcoma de Harvey, mientras que el mismo gene, pero en el genoma de ratón, se incorporó al virus de sarcoma de R6LR; los dos genes son idénticos y se consideran uno solo, llamado c-bas/has, o c-Ha-ras. Para estudiar estos genes se estableció una línea celular llamada Hs212 a partir de un carcinoma pulmonar. Se hicieron ensayos de transfección con ADN de la línea Hs242 en NIH-3T3, las cuales se transformaron, se analizaron con sondas de los genes Ki-ras y Ha-ras y solamente la sonda de Ha-ras detectó un fragmento, que se clonó y cortó con la enzima HpaI, cuyo sitio de corte se modifica cuando existe la mutación en el codón 12, obteniéndose fragmentos diferentes con el proto-oncogene que con el oncogene. Los fragmentos obtenidos correspondieron al proto-oncogene. Se determinó la secuencia del primer exón del oncogene de las células Hs212, y el codón 12 no se encuentra mutado. El mecanismo activante del oncogene de esta nueva línea debía ser diferente de los mecanismos conocidos, por lo que se secuenció todo el gene y se detectó una sola diferencia en el codón 61: El proto-oncogene codifica glicina, y el oncogene detectado codifica leucina. Esto significa que existe otro mecanismo de activación, mediante una mutación puntual en el codón 61, lo que sugiere que tal vez existen mutaciones activantes diferentes, e incluso distintos mecanismos, aun desconocidos, que activan a los genes ras.

BOO, J. L., TOROZ, D., MARSHALL, C. J., VERLAAN-DE-VRIES, M., VEENEMAN, C. M., VAN DER EIJ, A. J., VAN BOON, J. H., JANSEEN, J. M. G. y GERRITSCHEN, H. D. N. 1983. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. Nature 310:723-725.

La leucemia mielocida aguda es una neoplasia que se caracteriza por la proliferacion y diferenciacion anormal de celulas mieloides, monociticas y eritroides. El ADN de 5 pacientes con leucemia mielocida aguda se transfecto en celulas NIH-3T3, inicialmente sin que se indujera ninguna transformacion. Se cotransfecto el ADN de celulas tumorales seleccionadas in vivo con el plasmido pSV2-Nas, y se cultivaron las celulas transfectadas en presencia de antibioticos; solo sobrevivieron las que incorporaron tanto al plasmido como al ADN transformante. Las NIH-3T3 transfectadas se injertaron en ratones, en los que se desarrollaron tumores. El ADN de las NIH-3T3 transfectadas se hibrido con sondas de los genes H-ras, K-ras y N-ras, y solo hubo reconocimiento con N-ras. Al hibridar con sondas que contuvieran tanto al proto-oncogene como al oncogene mutado en el codon 12, y al oncogene mutado en el codon 61, ninguna de las 5 sondas detecto plenamente al oncogene alterado. En la bibliografia se ha reportado que las mutaciones dirigidas en el codon 13 de los genes ras tambien los activan, en experimentos in vitro, por lo que se hibrido con una sonda capaz de reconocer mutaciones en el codon 13, y con ella se detecto plgicamente al oncogene N-ras. La mutacion puntual del codon 13 consiste en un cambio de glicina en unos casos por valina y en otros por acido aspartico. Se analizaron directamente las muestras de sangre de los pacientes y tambien se detecto la mutacion en el codon 13 con lo que se demostro la existencia de este nuevo mecanismo de activacion, que se detecta con tecnicas mas sensibles, como las que se utilizaron en el presente trabajo, y que quizas por eso no se habia reportado anteriormente en muestras de tejido tumoral.

VIRUS

El oncoagente viral ratón fue descubierto en 1961 como la responsable de la capacidad leucemizante de dos tipos de virus de sarcoma murino de Harvey (HaMuSV) y el virus de sarcoma murino de Kirsten (KiMuSV) (Ishii y cols., 1961, ver pag. 29). Los dos virus tienen deficiencias para replicarse, y al entrar en una célula requieren de otros retrovirus para su replicación. Tienen la capacidad de transformar fibroblastos en maligno y de inducir en ratones inmunosuprimidos y nacidos de ratones HaMuSV y KiMuSV con virus que surtieron al infectar ratas por virus de leucemia murino, que es capaz de reconstituir transformativos (Harvey 1964; Kirsten y Harvey 1967).

Se pueden reconocer semejanzas tanto de origen viral como de origen celular en los virus KiMuSV y HaMuSV.

El oncoma de ratas virus pasó a clasificarse principalmente en 2 componentes (Chen y cols., 1978):

1. Dos regiones de secuencias homólogas al virus parental de leucemia murino, localizadas en la región del extremo 5' y los últimos pares de bases de la región 3' del ADN viral.

2. Un segmento proveniente del genoma de rata que incluye al oncogénico *v-Ha-ras*.

El virus de sarcoma murino de Harvey fue el primer virus capaz de sarcomatizar en mamíferos que se logró aislar, y surgió al infectar ratas con el virus de leucemia murino de Moloney (Mo-MuLV) con muestras obtenidas en dichas ratas se infectaron otras ratas, y así sucesivamente hasta que se obtuvo el virus HaMuSV. El genoma de HaMuSV mide 5.5 Kb aprox. esta compuesto por dos fragmentos de secuencias provenientes del virus Mo-MuLV parental un fragmento de 100 pares de bases en el extremo 5' y otro de 700 pares de bases en el extremo 3'. El resto de su genoma proviene del ADN celular de rata (4.5 Kb), en el que se incluye un segmento de 1.0 Kb. aprox. situado hacia el extremo 5' que corresponde al oncogénico *v-Ha-ras* (Ellis y cols., 1980) denominado *v-Ha-ras*, que ya se ha secuenciado en su totalidad (Dhar y cols., 1982).

El virus de sarcoma murino de Kirsten se origina en forma similar al de Harvey, mediante el pasaje del virus de leucemia murino de Kirsten en ratas. Incluye un segmento con secuencias del genoma de rata, de 4.5 Kb y 2 fragmentos con secuencias del virus parental, en los últimos 1000 pares de bases del extremo 3', y en los primeros 200 pares de bases del extremo 5' (Ishii y cols., 1978). El tamaño de su genoma es de 7.7 Kb aprox. y entre las secuencias de origen celular incluye un fragmento de 1 Kb aprox. ausente en el genoma del virus de Harvey. En el extremo 5', entre las secuencias provenientes del genoma de rata se encuentra el oncogénico *v-Ki-ras* en un fragmento de 1.3 Kb. aprox. también totalmente secuenciado. (Teuchida y cols., 1982).

En un principio se desconocía la relación entre estos oncogénos virales, por lo que se denominaba *v-Ha-ras* al *v-Ha-ras*, y *v-Ki-ras* al oncogénico *v-Ki-ras*; posteriormente al determinarse sus similitudes, se les unificó como oncogénos de la familia *ras*.

Los virus HaMuSV y KiMuSV son los que más se han estudiado, pero no son los únicos que tienen oncogénos *ras* también existen secuencias oncogénicas en el virus de sarcoma de rata de Rashed (Ra-MuSV) llamado oncogénico *v-Ra-ras* (Gonda y cols., 1982), y en el virus de sarcoma de ratón de BALB (BALB-MuSV) que en un princi

no se define como otro oncogene que se llamo v-bas pero despues se asoció con los genes ras (Andersen y cols., 1981).

Las semejanzas de los oncogenes del virus de BALB, y del virus de Rous se parecen mas a la secuencia de v-Ha-ras, posiblemente debido a que el proto-oncogene c-Ha-ras del genoma de rata, se incorporó de manera independiente en los virus HaMuSV y RaMuSV mientras que el proto-oncogene c-Ha-ras del genoma de raton se integro al virus BALB. Esto se ha demostrado infectando ratones con virus de leucemia murino, al tratar de recuperar nuevamente estos virus se les encuentra pero unidos a fragmentos celulares, en los que se han incorporado proto-oncogenes ras. (Fredrickson y cols., 1987).

Los oncogenes virales ras codifican una proteina conocida como p21 (Gibb y cols., 1979a) que es la proteina responsable de la transformacion maligna (Gibb y cols., 1979b). p21 consta de 189 aminoácidos y fue descrita aun antes que los oncogenes ras; en un principio se consideró como otro producto del oncogene src distinta de la proteina pp60-src que ya se conocia. Fue hasta dos años despues cuando se describio como producto de otro oncogene que se llamo ras, por "rat-sarcoma". Las propiedades bioquimicas de p21 viral son su afinidad por los nucleotidos de guanina (GTP y GDP), y su capacidad para autofosforilarse en la seronina-59, en presencia de GTP específicamente (Gibb y cols., 1980).

Las secuencias geneticas de v-Ha-ras y v-Ki-ras difieren un 25% en los primeros 105 nucleótos, pero sus correspondientes proteinas presentan solamente 17 aminoácidos diferentes. En el extremo amino terminal de ambas proteinas p21, la del oncogene v-Ha-ras y la de v-Ki ras existe una gran homologia, pues de 120 aminoácidos solamente 10 son diferentes, pero en el extremo carboxilo la homologia es mínima; de 22 aminoácidos solamente hay 5 iguales, y sin embargo ambas proteinas comparten el 81% de sus aminoácidos. Cabe señalar que de 147 nucleótos de bases en las secuencias de ambos oncogenes, 125 no alteran los aminoácidos codificados lo que indica que p21 se ha conservado mucho a lo largo de la evolucion, y tambien indica que al o los mecanismos mediante los cuales ambas proteinas virales son capaces de transformar deben ser muy similares (Dhar y cols., 1982 ver pag 38; Tsuchida y cols., 1982 ver pag 39).

HARVEY, J. J. 1964. An unidentified virus which causes the rapid production of leukemia in mice. *Journal of Virology* 1:104-107.

El virus de leucemia de Moloney (MLV), tiene la capacidad de inducir leucemias en ratones. Este virus se inyectó en un ratón, del cual se extrajo plasma que se inyectó en otros ratones y el plasma de este segundo ratón se filtró y se inyectó en otros 15 ratones recién nacidos, de los cuales cinco se observaron. A los 52 días 5 de estos ratones presentaban leucemias agudas y tres de ellos a cargo del sitio de inyección en la mayoría de los ratones la muerte fue causada por la ruptura del hígado aunque la velocidad de los datos, fue dependiente de la edad de los ratones, pero en los que tenían 1-7 días de edad, no desarrollaron tumores con células, al igual que en ratones de hasta 12 días, pero los 15 ratones de 12 días de edad inyectados, no presentaron las mismas células, pues de estos, 13 desarrollaron leucemias agudas y solo en 2 se presentaron tumores. Para determinar si en los ratones infectados aun se presentaba el virus de Moloney original, se inoculaban ratones de 2 días de nacidos con el plasma filtrado original, y se obtuvieron muestras de estos ratones a los 3, 10 y 54 días, los que a su vez se inyectaron en otros ratones de 1-7 días de edad. Las muestras de 10 y 54 días indujeron tumores y leucemias agudas después de 17-18 días y los ratones inyectados con las muestras de 3 días, desarrollaron leucemia hasta los 70 días, con lo cual se verifica que el virus MLV original seguía presente en las muestras sin embargo en la inducción de sarcomas no es una de las propiedades reportadas para el virus MLV, lo que sugiere que existe otro virus trans-ferente induciendo los sarcomas, pero no se encontró ningún otro virus contaminante. Se concluye que existe otro virus con capacidad para inducir sarcomas, transmitido o relacionado con el MLV, que aun no ha sido reportado.

ELLIS, R. W., GEFER, D., HARTMAN, J. M., YOUNG, M. A., SMITH, T. Y., CHANG, E. H., LEVY, S. D. y ROSENBERG, M. H. 1982. DNAI evolutionary relationships for the 3' noncoding sequences of Harvey murine sarcoma virus. *J. Virol.* 64:108-110.

Se obtuvo un mapa de mutaciones detallado del genoma del v1 rus de sarcoma murino de Harvey, con 3 fragmentos de dicho genoma cuyas secuencias se se sobrepusieron y con cada uno de los segmentos del genoma y con un soporte de la secuencia de base de donde provienen las secuencias insertadas en los virus de Harvey y Kirsten. Al hibridar la secuencia de base con el genoma viral, se encontró una región no homóloga hacia el extremo 5' con secuencias homólogas a ambos extremos. Con la región no homóloga se hibridó el genoma de rata, ratón, cerdo, pollo, detectándose en 1 a 2 segundos en cada caso. Con 2 fragmentos de la secuencia no homóloga se trató de identificar la región que modifica la proteína transformante p21, pero ninguno de los 2 fragmentos indujo transformación por sí solos, pero al unirlos al fragmento veciente de la unión presentó capacidad transformante. Esto indica que existe una región en el extremo 5' de ambos virus que es esencial para codificar la proteína p21, y por lo tanto para la oncogenicidad causada por el virus de Harvey.

DMAR, R., ELLIS, R. W., GIBBMAN, J., GIFFERT, A., BRITEL, J., LEVY, S. D. y SCOLNICK, E. 1982. Inclusion sequence of Mo-p21 transfigating protein of Harvey murine sarcoma virus. *Science* 217:924-927

Se analiza la secuencia de 165 del extremo 5', que modifica la proteína p21 de Harvey y sus sitios de regulación, y se encontró que esta secuencia tiene capacidad para codificar 3 proteínas distintas p30, p27 y p21, cuyas sitios de inicio de la traducción están en las posiciones 70, 142, y 195, con sus respectivas cajas TATA y sus tres codones potenciales de inicio de la traducción en las posiciones -53, -39 y +1 respectivamente. De estos 3 posibles polipeptidos solo se conoce la proteína p21, pero se ha reportado la existencia de una proteína que bien puede ser p30, un cantidad mínima, apenas detectables en células de línea de seno y p27 no se ha reportado. Se encontró un cuarto sitio de inicio de la traducción en la posición 16 en sentido inverso a los otros 3 por lo que no se considera viable, y también existe un promotor potencial de AP1-polimerasa III sobrepuesto parcialmente a los otros 3 promotores, cuyo significado funcional se desconoce. Al comparar las p21 de los virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten, se observó una gran homología, en la mitad de la proteína del extremo amino donde de 120 aminoácidos 110 son iguales. Por el contrario en el extremo carboxilo de 22 aminoácidos solo 3 son iguales. Es importante señalar que 19 de 33 cambios entre ambas proteínas son de tipo conservativo y que de los 162 cambios de base en sus secuencias genéticas, 105 no alteran los aminoácidos en las proteínas p21 de los oncogenes v-Ki-ras y v-Ha-ras.

SHIM, T. Y., YOUNG, W. A., GOFFIN, J. M. y SCOLNICK, E. M. 1978. Physical map of the Kirsten sarcoma virus genome as determined by fingerprinting RNAse H-digestions oligonucleotides. *J Virol* 25: 270-273.

Se analizaron los oligonucleótidos del virus de sarcoma murino de Kirsten (KMUSV) para determinar el mapa del genoma del virus. Se detectaron oligonucleótidos provenientes del virus parental de leucemia murina de Kirsten (KMUSV) en el extremo 3' del genoma del KMUSV con un tamaño de aprox. 1000 nucleótidos, a partir del cual las secuencias corresponden al genoma parental de rata, se extienden hasta muy cerca del extremo 5' y en el fragmento del extremo 5', de nuevo se encuentran secuencias del virus parental. Se comparó el genoma de KMUSV con el KMUSV de la secuencia del genoma celular homóloga a la del virus de Kirsten, y se encontraron más de 50% de bases similares entre ambos lo que indica que la secuencia de bases primaria se similar en más del 50% de ambos genomas. Se concluye que el virus de sarcoma murino de Kirsten, surgió por una recombinación entre los extremos 5' y 3' del virus de leucemia murina de Kirsten parental, y de un considerable fragmento de secuencias provenientes del genoma celular de la rata originalmente infectada por los virus de leucemia parentales.

TSUCHIDA, M., RYDER, T. y ONTSUDO, E. 1982. Nucleotide sequence of the oncogene encoding the p21 transforming protein of Kirsten murine sarcoma virus. *Science* 217:1937-1939.

La secuencia localizada entre los 1.7 kb y los 3.0 kb del extremo 5' del genoma de KMUSV que comprende al oncogene ras viral se analizó mediante delecciones inducidas. Se logró determinar la secuencia del oncogene, y se identificaron sus sitios de inicio y terminación de la traducción. Este oncogene tiene capacidad para codificar una proteína de 129 aminoácidos cuyo peso molecular calculado es de 21,000 daltons, la proteína p21. Se compararon las secuencias transformantes de ambos virus de sarcoma murino, el de Harvey y el de Kirsten (HMUSV y KMUSV) así como sus respectivas proteínas y se determinó que el oncogene de KMUSV es ligeramente mayor que el oncogene de HMUSV. Existe una gran homología entre las dos secuencias excepto por los 22 aminoácidos del extremo carboxilo de la proteína p21 de c-Ki-ras. En los primeros 165 aminoácidos, aunque el 25% de las bases son distintas, solo existen 17 aminoácidos diferentes, pues la mayoría de los cambios ocurren en la tercera base de cada codón diferente por lo que no se traducen en las respectivas proteínas oncogénicas, que son muy similares.

CONDA, H. A., YOUNG, H. A., STEIN, H. E., RACHOUD, P., TAJANOS, C. E., NAGASHIMA, K., LI, C.-C., SILVER, H. M. 1981. Molecular cloning, genome analysis, and biological properties of the leukemia virus and the non-oncogenic rat Rhabdovirus parental virus. *J. Virol.* 64:520-527.

El virus de sarcoma de rata de Rhabdov codifica una proteína con un peso molecular de 27,000 daltons que es idéntica al virus parental de leucemia de rata de Rhabdov. Esta proteína es el producto de una parte del genoma que viral y de una secuencia que codifica una proteína de 21 Md. asociada a la familia de oncogenes virales ras. El oncogeno del virus de sarcoma de Rhabdov (RasV) se denomina v-Ras. Se comparará la homología entre este oncogeno y otros oncogenes virales ras, analizando el microscopio electrónico los genes del virus RasV, del virus de leucemia de Rhabdov (RLV) y de los virus Harvey y Gibrov. Se encontró que en el virus de Rhabdov existen secuencias del virus RasV parental pero se conserva solo una parte del genoma que original e incluye la secuencia del gen ras del genoma de rata en el antígeno S'. En el microscopio electrónico se observa que el oncogeno del RasV presenta gran homología con el oncogeno del virus de Harvey pero que con el oncogeno del virus de Gibrov, con el que también tiene una importante homología. Se concluye que el mismo fragmento con el gen ras del genoma de rata, fue interporado por los virus de sarcoma murino de Harvey y de Rhabdov de manera independiente.

ANDERSEN, P. B., BEVARE, S. G., TRONICK, S. R., ELLIS, R. W., AARONSON, S. A. y COULTER, H. M. 1981. Separation of BALB-MuSV by type C virus transduction of homologous transforming genes for different species. *Cell* 26:129-134.

El virus de sarcoma de raton BALB (BALB-MuSV0), fue encontrado por su capacidad para inducir sarcomas en los ratones de la cepa BALB; esta capacidad esta dada por una secuencia transformante en el genoma viral, denominada oncogeno has. Se determino la secuencia del oncogeno has, hibridandolo con sondas de otros oncogenes y solo hibrido con la sonda del oncogeno del virus de sarcoma murino de Harvey. El oncogeno del virus de Harvey consta de un segmento de 750 pares de bases con el oncogeno has, ademas se encontro que la transformacion inducida con el virus BALB, esta asociada con la expresion de niveles elevados de una proteína con un peso molecular de 21,000 daltones, que se analizo inmunologicamente y resulto ser muy similar a la proteína p21 del virus de Harvey.

FREDRICKSON, T. N., O'NEILL, R. R., RUTLEDGE, R. A., THEODORE, T. G., HOPKIN, M. A., ROBERTS, L. R., MURFIN, J. B. y HARTLEY, J. N. 1987. Biología and molecular characterization of two newly isolated ras-containing murine leukemia viruses. *J Virol* 61:2109-19.

La transducción retroviral de oncogenes celulares provenientes de células malignas, es el mecanismo que confiere oncogenicidad a los virus. Este mecanismo se investigó inoculando virus de leucemia murina en ratones recién nacidos y adultos, sacrificados al presentar síndrome de inmunodeficiencia y linfadenopatía; las muestras de estos ratones a su vez se inocularon en otros, que presentaron leucemia y sarcomas. El ADN de estos últimos se analizó con sondas de Haras, Mimas, v-bas, v-mys, v-abl, y también se estudio su capacidad para transformar células NIH-3T3. En las muestras de un ratón con eritroleucemia y sarcoma de base se detectó un virus al momento transformante de las NIH-3T3, que se llamó NS.C58 MSV-1. Este virus es característico; tiene un tamaño de 8.8 Kb aprox., y su genoma híbrido con Haras y bas, y un poco menos con Ki-ras. Unos ratones se inocularon con este virus y otros con muestras de tumores inducidos con el mismo virus, y de ellos un 60% desarrollaron leucemias y linfomas y solo 2 desarrollaron sarcomas; en las muestras de uno de estos últimos se encontró un virus que se denominó NS.C58 MSV-2 cuya secuencia no se estudio tan detalladamente como la del NS.C58 MSV-1, pero se detectó una mutación de 100 a 200 pares de bases en la región 3' no codificante del gene ras que posiblemente es inserto. La secuencia del NS.C58 MSV-1 es casi idéntica a la del oncogene v-bas con solo dos nucleótidos diferentes, uno de ellos en el codón 12, que en v-bas codifica lisina y en el virus NS.C58 MSV-1 codifica arginina. Los dos virus NS.C58 MSV-1 y NS.C58 MSV-2 se inocularon en ratones recién nacidos, que murieron en 1-2 semanas independientemente del sitio de inyección. Se hizo lo mismo en ratones con más de 3 semanas de nacidos, y no resultaron susceptibles a la infección. Las lesiones causadas por estos virus y por los virus de BRLB, Harvey y Kirsten son iguales: sarcomas de base, nodulos linfáticos, músculo esquelético cerebro y médula ósea y eritroleucemias. Se concluye que la inserción de genes ras en retrovirus puede ocurrir al menos en el laboratorio, y probablemente también en la naturaleza, de manera espontánea.

SHIH, T. Y., WEEKS, M. G., YOUNG, H. A. y SOULNICK, E. H. 1977a. Identification of a specific virus which is oncogenic in nonproducer cells transformed by Kirsten or Harvey sarcoma virus. *Virology* 91:54.

Los virus de sarcoma murino de Harvey y de Kirsten tienen la capacidad de transformar células no cultivadas. Se estudió la oncogenicidad de ambos virus transformando células de ratón, de perro y de ricitón de rata, con el virus de sarcoma de Harvey, y estas células a su vez se infectaron con ratas, las cuales desarrollaron tumores. Con las ratas infectadas se preparó un antisuero, para impedir precipitar posibles proteínas virales y se detectó una proteína con un peso molecular de 21,000 daltones, que se llama p21, en células de ratón y de perro transformadas con el virus de Harvey. El mismo antisuero detectó una proteína similar en las células de mink transformadas con el virus de Kirsten. Se estudiaron ambas proteínas p21, la del virus de Harvey y la del virus de Kirsten y se determinó que las dos son fosfoproteínas. Se concluye que las 2 proteínas p21 detectadas, son codificadas por secuencias de los 2 virus que son homólogos.

SHIH, T. Y., WEEKS, M. G., YOUNG, H. A. y SOULNICK, E. H. 1977b. p21 of Kirsten murine sarcoma virus is thermostable in a viral mutant temperature sensitive for the maintenance of transformation. *J Virol* 21:546.

Se estudió la estabilidad térmica de la fosfoproteína p21 de KiMaSV, para establecer una prueba directa que demuestre si dicha proteína participa directamente en el proceso transformante inducido por el virus de Kirsten. Se transformaron unas células con el virus de Kirsten silvestre, y otras con un virus de Kirsten mutante llamado ts371 que se caracteriza porque su capacidad de mantener el fenotipo maligno en las células es sensible a la temperatura; a temperatura ambiente el virus es transformante y las células infectadas presentan un fenotipo maligno, pero al aumentar la temperatura, la oncogenicidad del virus se inactiva y las células recuperan su fenotipo normal. Se marcó p21 radiactivamente para cuantificarla en los dos grupos de células, cada uno a diferentes temperaturas, y se encontró una marcada diferencia en los niveles de p21 de las células transformadas con el virus silvestre, y las células transformadas con el mutante al elevarlas la temperatura. Se concluye que la proteína p21 es indispensable para mantener la transformación inducida por el virus de sarcoma murino de Kirsten.

SHIN, T. Y., BARONCOPPE, G. B., STONE, P. C., WICKS, M. G. y
SOOLNICK, E. H. 1980. Guanine nucleotide-binding and
autophosphorylating activities associated with the p21 onc
protein of Harvey sarcoma virus. *Science* 207:1080-1081.

Se caracterizó la proteína transformante p21, codificada por
el virus de sarcoma de Harvey, cuya genesis se transcrito en células
HIM-3T3, las cuales se transformaron y expresaron p21 viral.
Se encontró que la proteína p21 presenta afinidad por los nucleótidos
de guanina así como actividad de autofosforilación. El sustrato
nucleotídico con el que se lleva a cabo la reacción de auto-
fosforilación de p21 es GTP, y no se detecta otro sustrato fosfori-
labile por p21 mas que ella misma. Se estableció que la tempera-
tura óptima para la fosforilación de p21 es a 37 C, y el aminoácido
de fosforilado con el fosfato de GTP es la treonina. Estas caracte-
rísticas son totalmente diferentes a las de otras proteínas on-
cogénicas asociadas hasta ahora, como p10-v-src del virus de sag-
coma murino de Rous, los antígenos-T de adenovirus, de polioxa, y
de SV40 y p120 del virus de leucemia murino de Abelson, lo que su-
giere que los mecanismos por los cuales p21 induce la transforma-
ción son distintos de los que hasta ahora se han propuesto, y que
apenas empiezan a ser definidos; indica además que han de existir
otros mecanismos para inducir la transformación diferentes de los
que se conocen en la actualidad.

PROTO ONCOGENE C-RAS

En el genoma celular de una gran variedad de organismos existen genes homologos a los oncogenes v-ras detectados en los virus de sarcoma murino de Harvey y Kirsten. Estos genes se conocen en general como *c-ras* y constituyen una familia cuyos elementos principales son:

c-Ha-ras homologos a los genes v-Ha-ras del virus de sarcoma murino de Harvey,

c-Ki-ras homologos a los genes v-Ki-ras del virus de sarcoma murino de Kirsten,

N-ras, sin contraparte viral conocida.

Estos genes se han estudiado principalmente en el genoma humano, aunque existen genes *ras* en diversas especies.

En el genoma humano se han encontrado 5 genes de la familia *ras*:

c-Ha-ras-1

c-Ha-ras-2

c-Ki-ras-1

c-Ki-ras-2

N-ras.

c-Ha-ras-1, c-Ki-ras-2 y N-ras son funcionales, mientras que c-Ha-ras-2 y c-Ki-ras-1 no codifican ninguna proteina, y se consideran pseudogenes.

LOCALIZACION.

El gene c-Ki-ras-1, que es un gene inactivo, se localiza en el cromosoma 6, en la posicion 6p23-q12. Tambien en el cromosoma 4 se encuentran entre otros genes locados, el gene del complejo de histocompatibilidad HLA y el oncogene c-myc (Sakaguchi y cols, 1984).

El gene c-Ha-ras-2, considerado como pseudogene se encuentra en el cromosoma X, en la posicion pter-q28; este cromosoma es uno de los que mas se han conservado en la evolucion, por lo cual sus genes se han conservado mas que los de otros cromosomas (O'Brien y cols., 1983).

El gene activo c-Ki-ras-2 se encuentra en el cromosoma 12 en la posicion 12p11-12.1; en el cromosoma 12, se localiza el gene que codifica la enzima D-lactato-deshidrogenasa-B (D-LDH-B) y tambien el gene que codifica el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I) (Popescu y cols., 1983).

El gene c-Ha-ras-1, el segundo gene activo, está en el brazo corto del cromosoma 11 (McGruid y cols., 1982) situado en la posición 11p15.1-p15.5. En el cromosoma 11 está el gene que codifica al D-LDH-A, el de la insulina, el de la beta-globina, y el de la hormona paratiroidea (Fearon y cols., 1984). Cabe señalar el que 2 cromosomas cercanos, el 11 y el 12, presentan al menos 2 pares de genes similares:

Los genes c-Ha-ras-2 y c-Ki-ras-1, y

Los genes D-LDH-A y D-LDH-B.

Este hecho indica que una posible duplicación cromosómica pudo haber sido el origen de estos cromosomas, y por lo tanto es probable que los genes ras y los genes D-LDH tengan un origen común. (O'Brien y cols., 1983, ver pag 53). También se ha reportado en el brazo corto del cromosoma 11, asociado a c-Ha-ras-1, un gene asociado con la enfermedad maniaco-depresiva (Egeland y cols., 1987) aunque esto aún está a discusión. En el cromosoma 11 también está el gene que codifica la tirosina hidroxilasa (Hodkinson y cols., 1987).

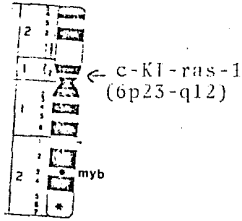
El gene N-ras se encuentra en el cromosoma 1, en la posición 1p11-13 (De Martinville y cols., 1983). El cromosoma 1 es el de mayor tamaño de todos los cromosomas humanos. En muestras de células malignas se han observado aberraciones cromosómicas del cromosoma 1 como deleciones, regiones de tinción homogénea y los llamados cromosomas "dobles minutos" (cromosomas aneústicos, típicos de células malignas), principalmente en neuroblastomas (Popescu y cols., 1985, ver pag 54).

ESTRUCTURA

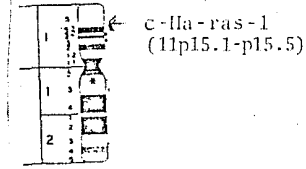
En general las secuencias de los genes ras del genoma humano son muy similares, pues las mayores variaciones existen en los troncos de los diferentes genes ras; los exones de los genes funcionales son muy similares, además de que los sitios de unión entre un exón y otro en cada uno de los genes corresponden entre sí, lo que sugiere un origen común a partir de un gene ancestral.

Existen regiones cuya secuencia presenta una marcada homología entre los diferentes genes ras; dichas regiones se sitúan entre las posiciones de los codones 1-120, 133-163 y 185-189. Asimismo existen regiones cuya secuencia presenta variaciones, situadas entre los codones 121-132 y 164-184. En las regiones constantes, las diferencias entre las secuencias de los genes c-Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras son mínimas, e incluso en los pseudogenes se observan muy pocas diferencias en estas regiones conservadas.

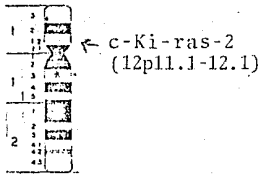
FIGURA 6
 LOCALIZACIÓN CROMOSOMICA DE LOS ONCOGENES ras EN EL GENOMA HUMANO



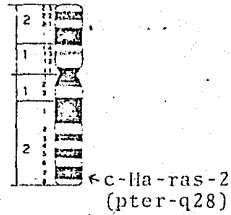
CROMOSOMA 6



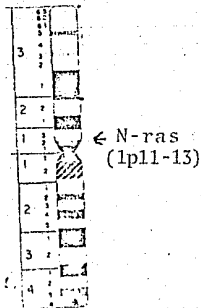
CROMOSOMA 11



CROMOSOMA 12



CROMOSOMA X



CROMOSOMA 1

El gen c-Ha-ras-1 consta de 4 exones y 3 intrones su tamaño es de 4.5 Kb aprox. (Santos y cols., 1982; Goldfarb y cols., 1982) sus exones codifican un total de 367 pares de bases, con capacidad para codificar una proteína de 187 aminoácidos, con peso molecular de 21300 daltons. La región promotora no presenta la caja TATA ni la caja CAAT, y en cambio tiene un muy alto contenido de GC (80%) así como múltiples cajas GC. Estas características las presentan los llamados genes domésticos, que codifican proteínas muy necesarias e importantes para las células (Ishii y cols 1985).

Al digerir el ADN de c-Ha-ras con la enzima BamHI el resultado da con varios fragmentos de distinto tamaño; este polimorfismo se debe a una región adyacente al gen localizada hacia su extremo 3 que consta de una secuencia que se repite en tandem un número variable de veces, conocida como región LTR (Long Terminal Repeat); los alelos cuyo número de repeticiones es mayor, se detectan como fragmentos de mayor tamaño que aquellos con menos repeticiones.

Se ha visto que algunos alelos se presentan con cierta regularidad en el genoma de células normales y se les llama alelos comunes, los cuales tienen tamaños de 0.9, 1.3, 2.0 y 3.3 Kb y existen otros que se presentan con escasa frecuencia se llaman alelos raros y su tamaño es variable (Krontiris y cols., 1985). Esta región al parecer funciona como un promotor fuerte (enhancer) en la transcripción de c-Ha-ras-1 (Spanakis y Holmes, 1987).

Comparada con el oncogene viral v-Ha-ras el gen celular presenta una homología de 88% en su secuencia genética la mayoría de las diferencias entre ambas secuencias están en el tercer nucleótido de los codones y son neutrales, por lo que la proteína resultante de ambos genes es prácticamente igual; ambas tienen un peso molecular muy similar, por eso se denomina p21 tanto a las proteínas virales como a las celulares. De los 189 aminoácidos totales de p21, notadamente existen 3 diferentes entre p21 viral y celular, las diferencias son:

codon 12: p21 viral - arginina; p21 de proto-c-Ha-ras-1 - valina. (Cabe recordar que el oncogene celular c-Ha-ras-1 también codifica arginina, considerada como la mutación activante de ras).
codon 59: p21 viral - treonina; p21 de proto-c-Ha-ras-1 - alanina
codon 132: p21 viral - glicina; p21 de proto-c-Ha-ras-1 - alanina (Capon y cols., 1983a).

El pseudogene c-Ha-ras-2 tiene una secuencia que corresponde a los exones del gen c-Ha-ras-1, pero no presenta las secuencias que corresponden a los intrones de c-Ha-ras-1. Carece de secuencias que señalen el inicio de la transcripción, y además presenta en diferentes posiciones, codones de inicio de la traducción y codones de terminación por lo que no puede codificar ninguna proteína. Comparando su secuencia con la de los 4 exones de c-Ha-ras-1 y con la del oncogene viral v-Ha-ras se observa una homología del 80%, si bien la carencia de intrones lo asemeja un poco más al on

cogene viral (Miyoshi y cols., 1984).

El gen activo c-Ki-ras se caracterizo en un principio en la linea celular SW620, de carcinoma de colon humano (McCoy y cols., 1983). Mide aprox. 40 Kb. y consta de 5 exones, llamados exon I, II, III, IVa y IVb. La secuencia de sus primeros 4 exones es equi valente a la secuencia del oncogene viral v-Ki-ras, con una homologia de 83%, y la del quinto exon corresponde a la secuencia localizada despues del codon de terminacion del gene viral. Los primeros 4 exones codifican una proteina de 189 aminoacidos que solo presenta 7 aminoacidos diferentes de la proteina p21 del oncogene viral. (Shimizu y cols., 1983a). Las diferencias son:

codon 12: p21 viral - serina; p21 de proto-c-ki-ras-2 - cisteina.
codon 31: p21 viral - glutamina; p21 de proto-c-ki-ras-2 -glicina
codon 37: p21 viral - glicina; p21 de proto-c-ki-ras-2 -glutamina
codon 59: p21 viral - treonina; p21 de proto-c-ki-ras-2 - alanina
codon 100 p21 viral - leucina; p21 de proto-c-ki-ras-2-isoleucina
codon 132 p21 viral - glutamina; p21 de proto-c-ki-ras-2 - acido aspartico
codon 187 p21 viral - valina; p21 de proto-c-ki-ras-2 -isoleucina

El quinto exon es muy semejante al cuarto por lo que se denominan IVa y IVb; IVa tiene 39 codones, y IVb tiene 38 codones. El gene c-Ki-ras-2 puede codificar 2 proteinas p21:

p21a, con los exones I, II, III, IVa; con 189 aminoacidos, y p21b, con los exones I, II, III, IVb; con 188 aminoacidos (McBrath y cols., 1983). Se han cuantificado ambas proteinas en diversas lineas celulares y en celulas normales, y p21a es en promedio 20 veces mas abundante que p21b (Capon y cols., 1983b). De estos 2 exones, el exon IVb se parece mas al cuarto exon del gene c-Ha-ras-1. En general las secuencias de aminoacidos de ambas proteinas, la codificada por c-Ha-ras-1 y la del gene c-Ki-ras-2 con el exon IVb, tienen una homologia de 84% encontrandose 2 regiones de variabilidad y 2 regiones conservadas. La region de mayor variabilidad esta entre los codones 171-185. La region de variabilidad menor esta entre los codones 121-126. Las regiones mas conservadas son: Codones 1-120 y 129-170.

El gene c-Ki-ras-1 es un pseudogene que mide 4.2 Kb, su secuencia es colinear con el oncogene viral v-Ki-ras y entre ambos se observa una homologia del 91%. Su secuencia es similar a 4 de los exones del gene c-Ki-ras-2, I-II-III-IVb y no presenta secuencias correspondientes a los intrones de c-Ki-ras-2. Su secuencia incluye varios codones de terminacion intercalados, por lo que carece de capacidad para codificar ninguna proteina (McBrath y cols., 1983)

El gen *N-ras* es un gen activo, encontrado en la línea celular de neuroblastoma SK-N-SH (Shimizu y cols., 1985b) Mide aprox 9.2 Kb., tiene capacidad para codificar una proteína de 189 aminoácidos con un peso molecular de aprox. 21 kd., la proteína p21, y consta de 4 exones, aunque se han reportado 7 exones, de los cuales 3 solo se transcriben en el ARN pero no se traducen; se consideran exones porque para detectar al ARN de *N-ras* se requiere hibridarlo con una sonda de ARN que incluya dichas secuencias exónicas, aunque no se traduzcan en la proteína; así es también el caso de la secuencia anterior al gen *c-Ha-ras*, que algunos autores denominan exon -1, o exon 0. Su región promotora muestra características similares al promotor de los genes domésticos por lo que debe ser un gen importante para las células (Hall y Brown, 1985). No presenta secuencias homólogas al exon IVb del gen *c-Ki-ras-2*. En la secuencia de p21 codificada por *N-ras*, existen 29 aminoácidos distintos de los aminoácidos correspondientes de p21 codificada por *c-Ha-ras-1*, y con p21 de *c-Ki-ras-2* las diferencias son 30. Las regiones de mayor variabilidad entre p21 codificada por *N-ras* y p21 codificada por *c-Ha-ras-1*, son la región de los aminoácidos 121-129 y la región de los aminoácidos 171-185; sin embargo en estas mismas regiones, entre p21 de *N-ras* y p21 del gen *c-Ki-ras-2* existe solo un aminoácido diferente (Japarowsky, y cols., 1984).

SARAGUCHI, S. Y., CASER, B. H., GRZESCHIK, K.-H., LAW, N. L., ELLIS, R., SCOLNICK, E. N. y MAYLOR, S. L. 1984. Regional localization of the human cellular Kirsten ras genes on chromosomes 4 and 12. *Mol Cell Biol* 4:767-773.

Se localizaron las regiones cromosómicas donde se encuentran los oncogenes c-Ki-ras-1 y c-Ki-ras-2. El gene c-Ki-ras-1 no es funcional mide aprox. 3.3 Kb, se localizo en el cromosoma 6 en la posición 6p33-q12. En este cromosoma tambien se encuentra el proto-oncogene *c-myc*. El gene c-Ki-ras-2 se encontro en el cromosoma 12 en la posición 12p12.03-pter, el mismo cromosoma donde esta el gene que codifica la D-lactato deshidrogenasa-A (D-LDH-A). Cabe mencionar que el gene c-Ha-ras-1, se encuentra en el cromosoma 17 donde esta el gene que codifica la D-LDH-B; esto apoya la teoria de que los cromosomas 11 y 12 provienen de un solo cromosoma, que se duplico en el transcurso de la evolucion. Es interesante que en el genoma de raton los genes c-Ha-ras y c-Ki-ras se localizan en los cromosomas 7 y 6, donde estan tambien los genes que codifican D-LDH-A y D-LDH-B respectivamente.

O'BRIEN, G. G., NASH, G. D., GOODWIN, J. L., LOWY, D. R. y CHANG, E. H. 1985. Dispersion of the ras gene family of transforming genes to four different chromosomes in man. *Nature* 302:839-841.

Se establecio la localizacion cromosomica de los 4 elementos de la familia ras en el genoma humano. Para ello se emplearon celulas somaticas hibridas de humano y raton y se seleccionaron las que conservaban una mayoria de cromosomas de raton, y pocos cromosomas humanos. Se analizaron estas hibridas con la sonda del proto-oncogene c-Ha-ras humano que hibrida en el cromosoma 11, donde se encuentra el c-Ha-ras-1 y donde tambien se localizan los genes de la fosfatasa acida 2 (ACP2) y de D-LDH-A. El gene c-Ha-ras-2, se detecta en el cromosoma X, pero en una celula donde habia una deletion del brazo largo del cromosoma X, se encontraron otros genes cuya localizacion en el cromosoma X es conocida, como el gene de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) y no se encontro al c-Ha-ras-2, por lo que debe estar cercano al centromero. Es interesante que c-Ha-ras-2 se encuentre en el cromosoma X, pues este cromosoma presenta muy pocas translocaciones y tampoco tiene interacciones con el resto de los cromosomas, por lo que sus genes se conservan mejor. Utilizando una sonda con la secuencia del gene v-Ki-ras se detecta al gene c-Ki-ras-1 en el cromosoma 6, y al gene c-Ki-ras-2 en el cromosoma 12. Falta aun determinar las regiones especificas en los que se encuentran los 4 genes ras.

PORESCH, H. G., ANDBAUGH, S. D., DIPAOLO, J. A., TRONICK, S. R., ARONSON, S. A. y SUKI, E. C. 1985. Chromosomal localization of 3 human ras genes by in situ molecular hybridization. *Som Cell Mol Genet* 11:149-56

Los genes ras tal vez interactuaron con sus genes vecinos, y por ello se determinó la región cromosómica específica en que se encuentran. En células víbriadas de humano y ratón se localizaron c-Ha-ras-1 en el cromosoma 3 región 12; c-Ha-ras-2 en el cromosoma 12, región 12p11.2-12.1, y K-ras en el cromosoma 1, región 1p11-12. La localización en estas regiones es interesante, pues se han reportado aberraciones cromosómicas como deleciones, regiones de tinción homogénea (HGR) y cromosomas "dobles minutas" (DM) en el cromosoma 1 en retinoblastomas donde también se ha encontrado un isocromosoma 6p característico. En melanomas malignos, se han observado isocromosomas 6p, así como otros rearrreglos del cromosoma 6, donde se localizan los genes del complejo de histocompatibilidad; los melanomas se caracterizan por ser de las pocas clases de neoplasias humanas que pueden ser reconocidos por el sistema inmune mediante la producción de un gran número de anticuerpos. En algunos casos de leucemia linfocítica crónica se han reportado trisomías del cromosoma 12 y en muestras de tumor de Wilms se han observado translocaciones entre los cromosomas 11 y 12. Posiblemente los genes ras tengan alguna relación con estas neoplasias.

MCPRIDE, D. W., SHAN, D. C., SANTOS, E., BAKBACID, N., TRONICK, S. R. y ARONSON, S. A. 1981. Localization of the normal allele of T24 human bladder carcinoma oncogene on chromosome-11. *Nature* 300:773-4

La línea celular de carcinoma de vejiga humana T24, tiene un oncogene muy similar al oncogene viral v-Ha-ras, con capacidad para transformar células en cultivo. Para saber si en el genoma de estas células difiere la localización del gene mutante se definió su localización cromosómica, hibridando células de humano y ratón y de humano y hamster. Se encontró c-Ha-ras-1 en el cromosoma 11 donde también está el gene de la lactato-deshidrogenasa-A. No se detectó ninguna diferencia en la localización del gene en células normales y en las tumorales lampeco rearrreglos, inserciones ni deleciones, lo que confirma que entre ambos genes la diferencia que origina su activación oncogénica debe ser muy pequeña, y bien podría ser la mutación puntual, como se ha reportado.

PEARSON, P. R., ANTONARAKIS, S. E., MEYERS, D. A. y LEVINE, M. A. 1981. The exact linkage map between beta-globin and insulin loci on human chromosome 11. *Am J Human Genet* 36:329-337.

El gen c-Ha-ras-1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 11, donde tambien estan los genes que codifican la beta-globina, la insulina y la hormona paratiroidea. Se estudio el orden en que se encuentran estos genes en el brazo corto del cromosoma 11 con varias hibridas de raton y humano y el orden definido fue: Centromero -- hormona paratiroidea -- beta-globina -- c-Ha-ras -- insulina con el gen c-Ha-ras localizado entre los genes de la beta globina y el de la insulina.

EGELAND, J. E., BERNARD, J. S., FAULS, D. L., SUSSEX, J. N., KIDD K. K., ALLEN, C. R., HUSTENYER, A. M. y HUBSNAN, D. E. 1987. Bipolar affective disorders linked to DNA markers on chromosome 11. *Nature* 325:763-767.

La enfermedad maniaco-depresiva bipolar es una alteracion siquiátrica, que se caracteriza por periodos de euforia y exceso de energia, alternados con periodos de depresion y letargo los periodos de mania se tratan con medicamentos a base de litio, y los depreivos, con drogas antidepressivas. La mania y la depresion son independientes de las circunstancias por lo que la causa de la enfermedad deben ser alteraciones de tipo neuronal. Se ha reportado una incidencia significativa en gemelos, familias y niños en adopcion, lo que sugiere que deben haber factores geneticos involucrados que se investigaron en la poblacion de los Amish en Pennsylvania pues sus cuidadosos registros generacionales muestran que sus 12,000 miembros descendian de 30 progenitores lo que permite esta elegir lineas geneticas bien definidas; ademas, las prohibiciones contra el alcohol y las drogas, el gran numero de hijos y la concentracion geografica facilitan los estudios; en ellos la incidencia de esta enfermedad es aprox. del 1% y suele presentarse entre los 15-25 años de edad al igual que en el resto de E. U. Se analizó la segregacion en familias con miembros enfermos, y se determinó un tipo de transmision autosomica de la enfermedad. Los resultados señalan que es muy posible que un solo alelo sea el que predispone a esta enfermedad y que la frecuencia de este alelo en la poblacion es de 0.021±0.002. Se analizo el genoma de los individuos afectados, y en el ADN recombinante de las muestras se detectaron diversos marcadores geneticos, y se identificaron los fragmentos de repeticion de longitud variable (RFLP's). Se encontro una asociacion entre el posible locus de la enfermedad, y 2 marcadores geneticos del cromosoma 11: el proto-oncogene c-Ha-ras-1, y el gen de la insulina, así como una alta incidencia de RFLP's lo grande establecieron una correlacion entre enfermos y alelos especificos de c-Ha-ras-1 e insulina. Se determinó la penetrancia del alelo de la enfermedad obtiendose datos significativos. Se concluye que la enfermedad maniaco-depresiva bipolar esta relacionada con un locus especifico asociado a los genes de insulina y con el proto-oncogene c-Ha-ras-1.

HOPKINSON, G., CHORNINGTON, R., BURLIN, H., MARCHBANKS, R.,
REEDERS, S., HALLLEY, J., NATHAN, H., PETERSSON, K. y BRYNJOLFSSON
J. 1997. Molecular cloning evidence for heterogeneity in manic
depression. *Mol Psychiatry* 2:287-300.

La enfermedad maníaco-depresiva es una alteración cíclica se
vera, que afecta aprox. a 7 de cada 1000 individuos en la mayoría
de las poblaciones. Se han estudiado familias con múltiples ca-
sos de la enfermedad, y sus datos son compatibles tanto con el ti-
po de transmisión genética autosómica dominante, como con el tipo
de unión al cromosoma X. Se considera que las drogas usadas para
controlar la enfermedad actúan sobre determinados neurotransmisso-
res del tipo de los sistemas de catecolaminas tales como la adre-
nalina, la noradrenalina, y la dopamina. Las mutaciones del gene
TH, localizado en el cromosoma 11 probablemente determinen el fe-
notipo de la enfermedad maníaco-depresiva pues este gene codifica
la enzima tirosina hidroxilasa que inhibe la síntesis de los tres
neurotransmisores. Se estudiaron 3 familias de Islandia con ele-
mentos enfermos, cuyos datos coinciden con el tipo de transmisión
autosómica dominante e indican la existencia de un alelo responsa-
ble de la predisposición a la misma; en las 3 familias se han re-
gistrado 44 casos entre 70 individuos en riesgo. Como marcadores
genéticos del cromosoma 11 se analizaron el gene TH, la region va-
riable del proto-oncogene c-Ha-ras-1 y la region variable del ge-
ne de la insulina para observar la segregación de RFLP's en las 3
familias. En los resultados obtenidos no se encontraron eviden-
cias de que exista una relación entre los marcadores genéticos, y
las 3 familias. Se concluye que en la enfermedad maníaco-depresi-
va existe una heterogeneidad genética. Este estudio puede aso-
ciar dicha enfermedad con un solo gene.

DE MARTINVILLE, C., GILCHRIST, G. H., HURRAY, H. J. y FRANCKE, U. 1987. N-ras oncogene assigned to the short arm of human chromosome 1. *Nucl. Ac. Res.* 15:5267-5273.

El elemento más recientemente caracterizado de la familia de oncogenes ras es el llamado N-ras encontrado en una línea celular de neuroblastoma. Esta relacionado tanto con los proto-oncogenes celulares c-Ki-ras y v-Ha-ras, como con los virales, aunque no se le ha encontrado una contraparte viral. Para determinar su localización cromosómica se fusionaron células de humano y hamster, y las células híbridas presentaron diferentes combinaciones de cromosomas. Se analizaron las híbridas con la sonda del gene N-ras, humano y se lo localizó en el cromosoma 1 en la región p32000-cen. Así pues, también este otro oncogene ras se encuentra en un cromosoma diferente de los cromosomas donde se localizan los demás genes ras humanos, aun cuando todos ellos guardan una estrecha relación estructural, y al parecer, también funcional.

SANTOS, E., TRONICK, G. R., BARONSON, S. A., PULCIANI, S. y BARROSO, M. 1988. T24 human oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 333:345-7.

La secuencia transformante de la línea celular T24 se ha caracterizado de manera preliminar. Se estudio esta secuencia con los oncogenes virales de los que existen sondas disponibles, e híbrido muy debilmente con v-myc, y más intensamente con v-bas, del virus de sarcoma de ratón BALB. La homología entre el gene humano y v-bas fue notable. Se detectó el transcrito del gene humano en ARNs de 1200 pares de bases. Los anticuerpos contra la proteína viral detectaron una proteína con un peso molecular de 21 Kd, al parecer muy relacionada con la proteína p21, codificada por el oncogene viral. La secuencia humana híbrido también con el oncogene v-Ha-ras del virus de sarcoma murino de Kirsten y la homología entre ratón también fue notable. Esto al parecer, sugiere que la secuencia transformante del genoma humano puede considerarse como la contraparte celular tanto del oncogene viral v-bas como del oncogene v-Ha-ras.

GOLDFARB, M., SMITH, R., MARONCO, H., WILSON, H. 1982. Isolation and preliminary characterization of a human transforming gene from T24 bladder carcinoma cells. *Oncogene* 1:109-119.

La línea celular T24 de carcinoma de vejiga humana se transformó cuando su ADN se transfectó en células NIH-3T3. Se caracterizó la secuencia humana involucrada en el proceso transformante, utilizando una estrategia de "clonado y rescate", que consiste en la construcción de una librería recombinada con fragmentos de ADN digerido con enzimas de restricción. Se usó como vectorio en un virus, el fago lambda, y se transfectaron en las células NIH-3T3, posteriormente se hizo la selección transformante, y se estimó que su tamaño no es mayor de 5000 pares de bases. Con esta secuencia se hizo una sonda para detectar muestras de otras genomas. La sonda hibridó con 40 muestras humanas tanto de líneas primarias como de líneas celulares, aunque los fragmentos recordados fueron de distinto tamaño, variando de 5 a 7 kb. También se hibridó con ADN de placenta humana y se detectó en fragmentos homólogos. Esto demuestra que el gene transformante de la línea celular humana T24 también existe en otras células humanas.

ISHII, S., BERLINO, G. J., PASTAN, I. 1980. Promoter region of the human Harvey ras proto-oncogene: similarity to the GGF receptor proto-oncogene promoter. *Science* 230:1378-1381.

Para entender mejor la regulación de los genes, no es necesario conocer sus regiones promotoras. Se estudió el promotor del gene c-Ha-ras-1, usando una sonda de ADN para detectar los transcritos, en células NIH-3T3 transformadas con el oncogene c-Ha-ras. Se encontraron 4 transcritos, sugiriendo que la transcripción de c-Ha-ras-1 se puede iniciar en 4 locos: el 537, 577, 601 y 681. El primer exón consta solamente de 46 pb, abarca del codón 537 al 576 y no se traduce, el primer intrón va del codón 577 al 601, y tiene una caja TATA, por lo que se consideraba como la región promotora; el segundo exón está formado por 101 pb, y abarca del codón 601 al 780, con una región no traducida de 30 pb, y 111 pb, que se traducen en los primeros 37 aminoácidos de p11. Se detectó principalmente el exón de 1.2 kb, el cual abarca el 1.6 región que incluye los codones 537 y 601. Como en la región anterior debe ser el promotor, un fragmento con esta región anterior se clonó en un plásmido, junto con el gene de la cloramfenicol acetil transferasa (CAT) y se observó que, en efecto, esta región de c-Ha-ras-1 funciona como un fuerte promotor, en secuencias este región y no se encontró caja TATA ni caja TATA, pero el contenido de G+C fue del 80%, la secuencia GGCC se repite 7 veces y la inversa, GGCCGG se repite 3 veces. Estas mismas características se presenaban en otros promotores, principalmente en los promotores de los genes llamados domésticos, por ser muy importantes para las células y probablemente sean una clave que ayuda a entender la regulación de los genes ras, que tal vez sean igualmente importantes.

SPANDIDOS, D. A., HOLMES, L. 1987. Transcriptional activity in the variable tandem repeat DNA sequence downstream of the human Ha-ras gene. *FEBS Lett* 218:41-46.

Los genes ras pueden activarse por activación puntual, aumento en el nivel transcripcional, amplificación genética, y por inserción de secuencias retrovirales. El proto-oncogene c-Ha-ras-1 humano tiene una secuencia estructural de 28 bases que se repite en tandem un número variable de veces (región VTR); dichas repeticiones determinan el polimorfismo de alílos ras observado al digerir con la enzima BamHI. Existen alílos con determinadas formas que se presentan con una incidencia significativa en algunos neoplasias, por lo que se estudió si la región VTR participa en la regulación de Ha-ras. Se construyó un plásmido con la región VTR del proto-oncogene c-Ha-ras-1 humano que mide aprox. 100 pb., junto al gene de la cloramfenicol acetiltransferasa (CAT), otro plásmido con la región VTR en dirección contraria al gene CAT, y otros dos plásmidos más, con la región VTR del c-Ha-ras-1 con mutación del codón 12 (de la línea humana T24), en ambas direcciones. Los plásmidos se transfirieron en fibroblastos de ratón. La región VTR aumenta la expresión del gene CAT en ambas direcciones, actuando como un promotor fuerte (enhancer), tanto la del oncogene como la del proto-oncogene, aunque la región VTR del oncogene en la misma dirección del gene CAT induce un incremento significativamente mayor que el resto. Se concluye que la región VTR del gene c-Ha-ras-1 humano, funciona como enhancer en la transcripción, y por lo tanto las mutaciones, amplificaciones u otras alteraciones en esta región, probablemente alteren la transcripción de c-Ha-ras, y esto constituiría otro tipo de mecanismo de activación de ras.

CARON, D. J., CHEN, E. W., LITVINSON, R. L., WILSON, T. W., COHEN, D. V. 1983. Clonación y caracterización de un gen humano con cinoma oncogénico and sus homólogos. *Nature* 303:30-32

Se clonaron el proto-oncogénico y el oncogénico a partir del genoma humano y se determinó que la diferencia estructural entre ambos es una mutación en el codón 12 al paraca y responsable de activar al gene. Se estableció la secuencia completa del gene. Está formado por 4 exones e interrumpido por 3 intrones, con capacidad para codificar una proteína de 11,000 daltones y 102 aminoácidos, la proteína p21. La homología entre p21 celular y viral resulta notable, pues solamente existen 6 diferencias entre ambos: codón 12: p21 viral-arginina, p21 celular-valina, codón 59: p21 viral-treonina, p21 celular-alanina, codón 123: p21 viral-glicina, p21 celular-valinina. La homología entre las secuencias genéticas de *hras* viral y celular es de 83%, pero entre sus respectivas proteínas p21 de 70%. Es interesante que una de las diferencias sea el codón 12, por la activación resultante, y otra diferencia sea en el codón 59, que en la proteína viral es el sitio de autofosforilación (treonina).

NIYOSHI, J., KASIMOTO, H., SCLDA, E., SAKAKI, Y. 1984. The *ha-c-Ha-ras-2* is a processed pseudogene inactivated by numerous base substitutions. *Nucl Ac Res* 12:1621-1626.

En el genoma humano existen 2 genes *ras* considerados pseudogenes pues no codifican ninguna proteína: *c-Ha-ras-2* y *c-Ki-ras-1*. Se estudió el *c-Ha-ras-2* y su secuencia resultó correspondiente a la del proto-oncogénico *c-Ha-ras-1*, pero sin intrones. En la región correspondiente al primer exón de *c-Ha-ras-1*, del codón 3 al 23, en los nucleótidos 341-433, la homología con *c-Ha-ras-1* es la máxima y a partir del codón 24 existe mayor variación, la homología entre los nucleótidos 363-490 es de un 80%. Otras 3 regiones son homólogas en más de 70%, en las posiciones de las bases 353-470, 361-579 y 752-848. La homología disminuye en la región correspondiente a la unión entre los exones 3 y 4, y es aún menor en el exón 2 y en la región 5' del exón 3. No existen secuencias que señalen el inicio de la transcripción, sitios CDP en el HRU ni codones de inicio de la traducción, además de que existen 3 codones de terminación en las posiciones de los codones 602, 707, y 807 por todo ello este gene no puede transcribirse ni traducirse. El codón 12 no corresponde a glicina como en *c-Ha-ras-1*, corresponde a valina como en el oncogénico viral. Posiblemente el pseudogénico *c-Ha-ras-2* se originó a partir de un ARN procesado de *c-Ha-ras-1*, sin intrones, que de alguna forma se insertó de nuevo en el genoma celular.

MCCOY, H. S., TIGLE, D. J., HIRSHBERG, R. H., CHASE, E. H., LOWY D. R., WEINBERG, R. A. 1983. "Characterization of a human colon/ lung carcinoma oncogene." Nature 302:77-81.

En el genoma humano existe cuando menos una secuencia genética responsable de inducir la transformación de células NIH-3T3, la cual se caracterizó en el ADN de la línea celular SW620 de carcinoma de colon humano que se transformó en células NIH-3T3, y a las células que se transformaron, a su vez se les extrajo el ADN para transferir otras, y así sucesivamente, hasta aislar la secuencia oncogénica. Se detectó un gene humano con gran homología con el oncogene viral v-Ki-ras del virus de sarcoma murino de Kirsten, la cual se aisló y analizó. Corresponde al c-Ki-ras-2 reportado, mide 30-35 kb. aprox. y codifica una proteína de 21 Kd, p21, con una homología del 90% con p21 del proto-oncogene c-Ha-ras. Se elaboró una sonda con la secuencia del gene c-Ki-ras para analizar diversas muestras y se detectó este gene en células NIH-3T3 transformadas con ADN de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón humano, así como en células transformadas con ADN de la línea Lx-1 de carcinoma de células pequeñas de pulmón. En células de estas líneas se detectaron más copias de c-Ki-ras que en células normales, indicando que la amplificación genética probablemente sea su mecanismo de activación.

SHIMIZU, K., BIRNBAUM, D., RULEY, M. A., PASANO, D., SWARD, Y., EDLUND, L., TAFAROWSKY, E., GOLDFARB, H., WIELER, M. 1983a. Structure of the Ki-ras gene of the human lung carcinoma cell line Calu-1. Nature 304:497-500.

Se estudió el oncogene c-Ki-ras de la línea celular Calu-1, transfiriendo su ADN sucesivamente en células NIH-3T3, hasta aislarlo. El gene está formado por 4 exones I, II, III y IV que codifican una proteína de 189 aminoácidos, p21, con solo 7 aminoácidos diferentes de la proteína v-Ki-ras viral. Las secuencias de los sitios de unión intrón-exón, son las correspondientes a las de c-Ki-ras-1 humano. Se encontró un quinto exón de c-Ki-ras llamado exón IVb, cuya secuencia es similar a la situada en el extremo 3' del oncogene viral. El péptido que codifica el exón IVb es de 58 aminoácidos, uno menos que el exón IVa. Los dos exones comparten los mismos 14 codones del extremo 3', y los mismos 5 codones del extremo 5', pero difieren en los codones intermedios. Entre las proteínas de c-Ki-ras y c-Ha-ras pueden diferenciarse dos clases de regiones: Las regiones constantes, comprendidas entre los aminoácidos 1-120, 133-163, y 180-189, donde solo hay 7 aminoácidos distintos, y las regiones variables, entre los aminoácidos 164-184 y 121-132, donde la variación es mucho mayor.

MOORATH, D. P., CAPON, D. J., GIBBY, D. H., CHAN, A. Y., SIEBAND, P. H., GOEBBEL, D. V., LEVINSON, A. D. 1985. Structure and organization of the human *Ki-ras* proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature* 304:501-505.

En el genoma humano existen 2 genes homólogos al virus ras viral c-*Ki-ras-1* y c-*Ki-ras-2*. Se compararon ambos. c-*Ki-ras-1* mide aproximadamente 4100 pares de bases y se correla con su homólogo viral, pero incluye numerosas sustituciones, inserciones y deleciones de nucleótidos, así como varias codones de terminación a lo largo de su secuencia y por ello no puede ser funcional; su secuencia presenta una homología de 81% con el gene viral y-*Ki-ras*. El gene c-*Ki-ras-2* mide aprox. 33000 pares de bases, está formado por 4 exones, y tiene capacidad para codificar una proteína de 21 kd. La secuencia de c-*Ki-ras-1* codifica a la de c-*Ki-ras-2* pero solamente a los exones, por lo que se piensa que pudo originarse a partir del transcrito de c-*Ki-ras-2*, que logró insertarse de nuevo en el genoma celular.

CAPON, D. J., SIEBURG, P. H., MOORATH, D. P., MAYFLICK, J. C., EDMAN, U., LEVINSON, A. D., GOEBBEL, D. V. 1985b. Activation of *Ki-ras* gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature* 304:507-512.

Para estudiar los mecanismos de activación del gene c-*Ki-ras* humano, se analizó el genoma de las líneas celulares de carcinoma de colon y pulmón, se hibridó con la sonda del oncogene y-*Ki-ras* viral y la secuencia detectada fue clonada y aislada. El gene humano c-*Ki-ras-2* tiene capacidad para codificar dos proteínas, una con los exones I-II-III-IVa formada por 187 aminoácidos y la otra con los exones I-II-III-IVb formada por 188 aminoácidos. Se estudiaron ambas proteínas; las dos son idénticas en los 180 primeros aminoácidos del extremo amino y después varían; la que incluye al exón IVa, p21a presenta 39 aminoácidos, y la que codifica el exón IVb, p21b presenta 38 aminoácidos, aunque en ambos casos la mayoría son aminoácidos básicos. Se cuantificaron ambas proteínas p21, y la proteína p21b resultó ser la más abundante, no solo en los carcinomas de colon y pulmón estudiados sino también en otras líneas celulares, como la línea SK-N-SH de neuroblastoma humano, que presenta al gene *R-ras* activo, y también en linfocitos normales y en células embrionarias humanas; en todas se encontró 10-20 veces mayor cantidad de la proteína p21b que de la p21a. Respecto a los mecanismos de activación, en 4 de 5 líneas celulares estudiadas se encontró c-*Ki-ras* amplificado, y también se determinó que, en las proteínas proto-oncogénicas el aminoácido 12 es glicina, y en las proteínas oncogénicas el aminoácido 12, en unos casos es valina y en otros es cisteína; en el gene c-*Ha-ras* humano la mutación puntual en este sitio es el mecanismo reportado de activación. Esto implica que los genes ras pueden tener al menos dos mecanismos de activación, mutación puntual del codón 12 y amplificación genética.

SHIMIZU, K., SOUCHEKRE, M., PERUCHO, H., WIGLER, D. 1986. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc Natl Acad Sci 83:383-387.

La línea celular SK-N-SH proviene de un neuroblastoma humano. El ADN de estas células se transfirió en células NIH-3T3, las cuales se transformaron, y en las transformantes se seleccionó la secuencia de origen humano responsable de inducir la transformación de estas células NIH-3T3. La secuencia detectada fue aislada, y con ella se elaboró una sonda para estudiar el ADN de células humanas y de ratón, normales y transformadas y se encontró un mismo fragmento de 7.2 kb, en todas las muestras. El gene detectado al parecer está relacionado con los genes miembros de la familia ras.

HALL, A., BROWN, R. 1985. Human N-ras cDNA cloning and gene structure. Nucl Ac Res 13:5255.

Se clonó el gene N-ras del genoma humano para estudiar su estructura y expresión. Se detectaron 2 ARN^m transcritos por N-ras, uno de 5 kb. y otro de 2 kb., el transcrito mayor es aproximadamente 3 veces más abundante que el menor y la diferencia entre ambos es un fragmento localizado en el sitio de terminación. Se analizaron los 2 transcritos, y se determinó que el gene N-ras consta de 7 exones, 4 de los cuales son traducidos. Las secuencias que separan a los exones e intrones equivalen a las de c-Ha-ras y c-Ki-ras. Se analizaron las secuencias de la región promotora y del sitio de inicio de la transcripción y se encontró un patrón muy similar al de los llamados genes domésticos que siempre se expresan por ser muy importantes para la célula, como el gene de la adenosin-desaminasa y el de la HMG CoA reductasa. Dicho patrón consiste en múltiples sitios de inicio, una caja TATA no muy definida, múltiples tripletes ATG cercanos al codón de inicio, y la presencia de secuencias GGGGGG (o CCGCCC) alrededor del promotor. Estas características sugieren que N-ras y su expresión, deben ser muy importantes para las funciones normales de la célula.

TAPAROWSKY, E., SHIMIZU, K., GOLDFARD, M. *et al.*, 1981.
Structure and activation of the human *ras* gene. *Cell* 31:831-3.

Se secuenció el gene *N-ras* humano y se le encontró gran homología con los genes *c-Ha-ras-1* y *c-Ki-ras-2* humanos. Los 3 genes presentan una estructura intrínseca común y comparten secuencias exónicas muy similares. El oncogene *N-ras* de la línea celular de neuroblastoma humano SK-N-SH, presenta actividad transformante, y el *N-ras* de células normales no la presentó. La única diferencia entre el *N-ras* oncogénico y el normal es una mutación puntual del codón 61: El proto-oncogene codifica lisina y el oncogene, glutamina. El gene está formado por 4 exones, y codifica una proteína de 189 aminoácidos. Se hizo una comparación entre la secuencia y la de los otros genes *ras* humanos y se definieron 2 regiones, entre las posiciones 1-120 y 129-186, donde el máximo número de diferencias entre cualesquier par de genes *ras* es de 12 aminoácidos. En la región comprendida entre los codones 121-128, la homología disminuye y en las posiciones 171-185, existe la menor similitud.

RAS EN OTRAS ESPECIES

Los genes ras se han encontrado en gran variedad de organismos, desde mamíferos hasta bacterias. Cabe señalar que en esponjas y *Escherichia coli* se encontraron de manera casual, mientras que *D. melanogaster*, *E. coli*, ratas y levaduras, son los organismos más empleados en todo tipo de experimentos, por lo que se les ha estudiado extensivamente. El hecho de que sean pocos los trabajos en los que específicamente se hayan tratado de encontrar genes ras en otras especies y sin embargo se les haya encontrado en tantas y tan diversas, indica que lo más probable es que en muchas otras especies también existan genes ras o genes relacionados con ras. Después del genoma de mamíferos los genes ras se reportaron en el genoma de *Drosophila melanogaster*.

Drosophila melanogaster

Después del genoma de mamíferos los siguientes organismos en donde se detectó la existencia de genes muy similares a los genes ras fue en *Drosophila melanogaster* (Shilo, 1981). Existen 3 genes ras en *D. melanogaster* localizados en las posiciones 850 (Dmrasi) 64B (Dmras2), y 62B (Dmras3) del cromosoma 3. Los genes Dmrasi y Dmras2 constan de 3 exones y 2 intrones, mientras que Dmras3 parece carecer de intrones. La proteína del gene Dmrasi tiene una homología de 81% con p21 del gene c-Ki-ras-1 humano, y es más parecida a los genes humanos que a Dmras2. Dmrasi o a los genes de levadura y la homología entre p21 de Ras y la proteína de Dmras2 es de 58%. Dmrasi y Dmras2 terminan con la secuencia CysAAZ, donde A es un aminoácido alifático, y X es cualquier aminoácido. La homología entre las proteínas de Dmrasi y Dmras2, y entre éstas y las proteínas ras humanas, decrece notablemente en el extremo carboxilo, pero las proteínas de *D. melanogaster* terminan con la misma secuencia que las proteínas ras de mamífero. Lo que coincide con las regiones más conservadas en las proteínas ras de mamífero y de levaduras (Brock, 1987).

El gene Dmrasi codifica una proteína de 190 aminoácidos con un peso molecular de aprox. 21,000 daltones (Nowan-Gilberberg, 1984). El gene Dmras2 codifica una proteína de 195 aminoácidos con un peso molecular de aprox. 22,700 daltones. La transcripción del gene Dmras2, se mantiene en un mismo nivel a lo largo de todo el ciclo de vida de *D. melanogaster* desde la eclosión hasta la etapa adulta, indicando que la expresión de Dmras2 no parece estar relacionada directamente con la diferenciación o proliferación de las células de *D. melanogaster* y por lo tanto la proteína de Dmras2 no debe tener otras funciones, aunque es posible que se exprese dicha proteína durante todo el ciclo vital puede deberse a que esta proteína cumple un papel determinante para que pueda mantenerse el estado proliferativo de las células (Mazer 1985).

Saccharomyces cerevisiae

En el genoma de Saccharomyces cerevisiae existen 2 genes homólogos a los genes *ras* de mamíferos (Defco-Jones y cols., 1983), llamados *RAS1* y *RAS2*. La proteína *RAS1* está constituida por 309 aminoácidos y pesa 40 kd., mientras que *RAS2* consta de 322 aminoácidos y su peso es de 41 kd. (Dhar y cols., 1984), entre las dos secuencias se observa una marcada homología hasta el codón 180, a partir del cual la homología disminuye considerablemente.

La secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por los genes humanos y los genes *RAS1* y *RAS2* muestran una importante homología; comparada con la secuencia de aminoácidos de la proteína de c-Ha-ras humana, pueden diferenciarse 7 regiones; partiendo del aminoácido 3 de la proteína humana, y el aminoácido 10 de las 2 proteínas de levadura, los próximos 30 aminoácidos muestran una homología de casi un 70%, los siguientes 30 aminoácidos de ambas proteínas, una homología aprox. de 50%, y a partir del aminoácido 180 la divergencia es mayor. Entre las proteínas de los genes humanos c-Ha-ras, v-Ki-ras y N-ras, las regiones de homología y variabilidad coinciden con las proteínas de levadura, indicando una interrelación entre dominios, posiblemente funcionales que han sido muy conservados durante millones de años. Las proteínas *RAS* de S. cerevisiae, precipitan con anticuerpos monoclonales que detectan p21 del virus de sarcoma murino de Harvey, y que también reconocen proteínas *ras* de mamífero (Powers y cols., 1984).

Las proteínas *RAS* de S. cerevisiae son indispensables para la viabilidad celular; la falta de ambas es letal para las células y debe existir al menos una de las dos proteínas *RAS*. *RAS1* y *RAS2* tienen funciones distintas: Participan en la regulación de la adenil ciclasa que provee de AMPc a las células, principalmente *RAS2*; *RAS1* tal vez interviene en la regulación del metabolismo de fosfolípidos (Ver el capítulo Función de Proteínas *ras*).

En células de S. cerevisiae que presentan disrupción en *RAS1* y *RAS2*, la proteína c-Ha-*ras* de mamífero con leves modificaciones al ser microinyectada demuestra tener la capacidad de restablecer la viabilidad celular. Además los genes *ras* híbridos de mamífero y levadura, y también los genes *RAS* de levadura, con una mutación del codón 12 que activa los oncogenes *ras* de mamíferos inducen la transformación de células NIH-3T3 al igual que con p21 oncogénica de mamífero. (Defco-Jones y cols., 1985).

Schizosaccharomyces pombe

Los genes *ras* también se han detectado en otra especie de levaduras, Schizosaccharomyces pombe, en cuyo genoma existe un gene de la familia *ras* llamado *SPRAS*, que codifica una proteína de 219 aminoácidos. La disrupción de este gene no resulta letal para las células, no altera los niveles de AMPc ni la adenil-ciclasa, pero sí causa cambios fenotípicos pues produce deformaciones celulares. En S. pombe la función de la proteína *SPRAS* parece estar relacionada con la diferenciación sexual *ras* que con la división celular a diferencia de la función de las proteínas *RAS* en S. cerevisiae. (Nadin-Davis y cols., 1986).

Es de resaltar el hecho de que genes de la familia ras de es pecies tan relacionadas como *S. scrofularia* y *S. pombe* muestran las ciones tan diferentes en el establecimiento celular para esta mutacion que aunque los genes ras actúan tan conservados en especies muy di versas, la función que cumplen en cada especie no es necesariamente la misma en todas, y por lo tanto, los resultados obtenidos al determinar la función de los genes ras en otros organismos han de interpretarse con cuidado al extrapolarse al caso de mamíferos.

Genoma murino

En el genoma de la rata existen genes muy similares a los ge nes ras humanos, cuyo estudio es muy importante no solo por el he cho de que de su genoma pudieron originarse los genes ras virales sino tambien por lo mucho que se han estudiado la expresion y fun cion de los genes ras en los experimentos hechos en ratas (Ver en cogene ras). En el genoma de rata existen tambien 2 genes homolo gos al gene viral Ha-ras, llamados c-Ha-ras-1 y c-Ha-ras-2 (Ellis y cols., 1981 ver pag 29) y al menos un gene c-Ki-ras. En el gene ma de rata, c-Ha-ras-1 se localiza en el cromosoma 1, c-Ha-ras-2 en el cromosoma X, y c-Ki-ras en el cromosoma 4 (Spirer y cols., 1985). El gene c-Ha-ras-2 de rata es un pseudogene, pero el gene c-Ha-ras-1 es un gene activo que codifica una proteina p21 identi ca a p21 del gene c-Ha-ras-1 de humano; la secuencia nucleotidica de los genes activos Ha-ras de humano y rata es homologa en un 88% y la homologia entre Ha-ras-1 de rata y v-Ha-ras es aun mayor, sobre todo entre sus proteinas, pues entre p21 de v-Ha-ras y p21 de c-Ha-ras-1 de rata solo existen dos cambios en los aminoacidos 12 y 59, precisamente los que le confieren oncogenicidad a p21 viral por lo que se considera al gene c-Ha-ras-1 de rata como la secuen cia que se incorporo en el genoma viral, originalmente sin ningun cambio y por una seleccion artificial al estudiar y aislar los vi rus ras tumorigenicos fueron seleccionandose los cambios que acen tuaron su oncogenicidad (Rata y cols., 1986). En el genoma de ra ton, otro organismo muy empleado en experimentos de induccion tu moral, tambien se han descrito genes ras, y en particular el gene c-Ki-ras el cual se activa con ciertos carcinogenos; este gene es practicamente igual al gene c-Ki-ras humano y su protomero tambien tiene las caracteristicas de los genes domesticos (Hoffman y cols 1987). El gene H-ras de ratones es tambien muy similar al humano pues solo existen 51 bases diferentes entre ambos, y de estos cam bios solo 3 se traducen en diferencias en la secuencia de la pro teina. (Guerrero, y cols., 1985; ver pag 182)

Genes ras en otros organismos

En los peces dorados, se han detectado al menos 3 genes ras, de los cuales uno es la secuencia. Este gene tiene una homología del 76% con el gene c-Ki-ras humano, codifica una proteína de 183 aminoácidos, y su peso molecular es de 21 Kd (Nasais y cols., 1986).

En el protozoo *Dictyostelium discoideum* existe un gene de la familia ras, llamado Dd-ras, que codifica una proteína con un peso molecular de 23,000 daltones y que está relacionada estructuralmente con p21-ras de mamíferos (Pauson y cols., 1988). El gene Dd-ras se expresa en forma preferencial en ciertas etapas del ciclo celular de *D. discoideum* (Reymond y cols., 1984) y al parecer cumple una función primordial pues su carencia causa alteraciones fenotípicas celulares (Reymond y cols., 1984).

Genes relacionados con la familia ras

Se han reportado otros genes relacionados con los genes ras, que si bien presentan ciertas características comunes, no presentan una homología lo suficientemente significativa como para considerarlos elementos de la familia ras, pero que es importante conocer.

En los ganglios abdominales del molusco *Aplysia californica*, existe un gene llamado rho, por ras-homologo. El gene rho codifica una proteína homóloga en un 35% con p21 de c-Ha-ras, ambas proteínas pesan 21 Kd y conservan la misma secuencia carboxilo terminal requerida para la unión membranal. Existen genes rho también en el genoma de rata, de *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* y humano. Entre los genes rho de mamífero y de *A. californica* existe una homología de 85% (Madaule y Axel, 1985); e incluso al parecer también existe una homología funcional entre las proteínas rho de humano y de *A. californica* (Anderson y Lacal, 1987).

En el genoma humano existe un gene S-ras (relacionado a-ras) que también se presenta en el genoma murino, con el que tiene una gran homología (Lowy y cols., 1987).

El gene raf (rap-like) se detectó en linfocitos de simio, codifica una proteína de 206 aminoácidos, cuyo peso molecular es de 23.5 Kd., y tiene una homología de 52% con p21 de H-ras, K-ras, y N-ras de mamífero, además de que presenta ciertas secuencias idénticas, que son las que codifican las regiones de p21 que interactúan con GTP y con la membrana (Chardin y Yavittian, 1986).

En *Saccharomyces cerevisiae* existe un gene que originalmente se llamo YP2 y que ahora se conoce como YPT1, el cual tiene algunas similitudes con los genes ras de mamífero. El gene YPT1 codifica una proteína de 206 aminoácidos cuya homología con p21 de Hg mano es de 35% en los primeros 176 aminoácidos de ambas proteínas. Entre estas 2 proteínas existen regiones de divergencia que coinciden con las regiones donde mas difieren todas las proteínas ras (Gailwitz y cols., 1983). Para las células de *S. cerevisiae*, la proteína YPT1 es indispensable, y al parecer esta relacionada con la organización de los microtubulos celulares (Schmitt y cols., 1986).

En *Escherichia coli* existe un gene relacionado con los genes ras, llamado era (*Escherichia-ras*). El gene era codifica una proteína de 316 aminoácidos, similar a las proteínas RAS de levadura y que al igual que las demás proteínas ras, tambien presenta afinidad por nucleótidos de guanina (Ahn y cols., 1983).

En el genoma murino tambien se han descrito otros genes relacionados llamados rab1, rab2, rab3 y rab4 que comparten las regiones mas representativas de los genes ras; estos genes tienen cierta homología con los genes YPT1 de *S. cerevisiae* (Touchot y cols., 1987). Además en el genoma murino se ha detectado otro gene, llamado BRL-ras (Bucci y cols., 1983).

En la esponja *Geodia cydonium* se ha descrito un gene ras que parece participar en la división de las células (Schroder y cols., 1988).

En la planta de maiz *Zea mays* tambien existen genes ras, que parecen estar involucrados en procesos de división y diferenciación celular (Zabulonis y cols., 1987).

Existen diversas especies de hongos (*Saccharomyces aluvius*, *Candida ishiwadae*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Nichia stipitidis*, *Ceratocystis ulmi*, *Schwanniomyces occidentalis*, *A. castellii*, *Embryosium tanoshilum* y *Subileobvium comune*) en las cuales tambien se han encontrado secuencias relacionadas con ras (Prakash y Seligy, 1985).

SHILO, B.-Z., MELBERG, R. H. 1981. DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci 78:6789-6792.

Las secuencias de oncogenes tienen la particularidad de estar muy conservadas en distintas especies, sobre todo entre vertebrados. Para saber si existen secuencias similares en el genoma de *Drosophila melanogaster* se analizó su ADN con 6 sondas diferentes con la secuencia de otros tantos oncogenes virales y con 3 de dichas sondas se detectaron secuencias homologas en el genoma de *D. melanogaster*. La sonda del virus de leucemia de Abelson (oncogene *abl*) hibridó con un fragmento y otras 4 sondas, la del virus de sarcoma de Harvey (oncogene *v-Ha-ras*), del virus MS27 (*v-myc*), del virus de sarcoma de ave (ASV), y del virus de sarcoma felino (FeSV), reconocieron varias secuencias. Al estudiar el genoma de otros organismos se encontró que en nemátodos, hibridaron las sondas del virus de Abelson y la del virus de Harvey, la sonda del virus MS27 reconoció 3 bandas; en el erizo de mar solo hubo un reconocimiento muy débil con la sonda del virus de Abelson. Esto indica que las secuencias oncogénicas están más conservadas, y existen en organismos aun más diversos de lo reportado hasta ahora.

BROCK, H. W. 1987. Sequence and genomic structure of *ras* homologues *Dmras208* and *Dmras40* of *Drosophila melanogaster*. Gene 51:127-137.

En el genoma de *D. melanogaster*, existen 3 genes homologos a los genes *ras* humanos, los genes *Dmras1*, *Dmras2* y *Dmras3*. El gene *Dmras3*, al parecer carece de intrones. *Dmras1* y *Dmras2* constan de 3 exones y 2 intrones, *Dmras1* codifica una proteína de 190 aminoácidos y *Dmras2* una proteína de 195 aminoácidos. Se compararon las secuencias de ambos con los genes *c-Ha-ras*, *c-Ki-ras*, y *H-ras* humanos y con los genes *Ras1* y *Ras2* de levadura, y se encontró que el gene *Dmras1* se parece más a los genes humanos que a los de levadura, y aún al *Dmras2*. Los primeros 79 aminoácidos de *Dmras1* y de *c-Ki-ras* son idénticos, en los aminoácidos 80-113 la homología es de 78%, disminuye a un 26% en los aminoácidos 121-152, aumenta a 87% en los aminoácidos 153-164, y prácticamente desaparece en el extremo carboxilo. En total la homología entre el gene *Dmras1*, y *c-Ki-ras* es de 81.5%, entre *Dmras1* y *c-Ha-ras* es de 78.5% y entre *Dmras1* y *H-ras*, es de 77.5%. Entre *Dmras1* y *Dmras2*, la homología es de 56%. Con relación a los genes de levadura, la homología entre *Dmras1* y *Ras1* es de 61%, con *Ras2* es de 62%, y entre *Dmras2* y *RAS1*, de 63% y con *RAS2*, 62%. Las regiones de variabilidad y homología corresponden a las del resto de los genes *ras*, sin embargo los sitios de corte entre intrón y exón, y la posición de los intrones, son distintos de los sitios correspondientes en los genes humanos. Las diferencias entre ambos genes de *D. melanogaster* sugieren que tal vez estos tengan diferentes funciones en las células, aunque falta por conocer cuales sean.

NEWMAN-SILBERBERG, P. H., SCHAFER, D., HERTMAN, P. H., WILK, B. Z. 1984. The *Drosophila* ras oncogenes: Structure and nucleotide sequence. Cell 37:1927-1936.

Usando una sonda con la secuencia de c-Ha-ras, se detectaron 3 genes homólogos en el genoma de *Drosophila melanogaster*, localizados en las posiciones 85B, 84A, y 82A, en el cromosoma 3; los 3 parecen ser funcionales. Se secuenciaron el gene de la posición 85B, llamado Dras1, y el de 84A, llamado Dras2; ambos genes tienen capacidad para codificar una proteína de 170. Dras1 tiene 4 intrones y un total de 567 codones, que corresponden a 189 aminoácidos, su proteína presenta una homología total de 10% con respecto al gene c-Ha-ras humano, la similitud es menor entre los aminoácidos 1-121, y 137-164, en la posición 12 codificada glutamina, en la 61, glutamina, y en la 59, alanina, igual que los proto-oncogenes humanos. El gene Dras2 al parecer tiene un intrón, codifica una proteína de 186 aminoácidos que tiene una homología total de 30% con respecto a la proteína de c-Ha-ras, homología que es más marcada en los aminoácidos 26-120 y 139-161, con estas homología en los primeros 27 aminoácidos del extremo amino esta región es donde se observa la mayor homología en las diferentes proteínas p21. Dras2 codifica asparagina en la posición 12, en la 61, fenilalanina y en la 59 glutamina, lo cual no corresponde con ningún otro gene ras. En el extremo carboxilo la variación deja de ser significativa igual que en el resto de los genes ras, aunque la secuencia de Dras1 y de Dras2, es más parecida a la del exon IV codificado por el gene c-Ki-ras humano, en las posiciones correspondientes.

MOZER, B., MARLOR, R., PARKHURST, S., CRUICK, V. 1985. Characterization and developmental expression of a *Drosophila* ras oncogene. Mol Cell Biol 5:885-889.

Se estudió uno de los 3 genes ras existentes en el genoma de *D. melanogaster*, el gene Dras2. Se encontraron 2 regiones intrónicas en la secuencia de Dras2, que tiene capacidad para codificar una proteína de 170 aminoácidos con un peso molecular de 22.7 Kd. Comparándola con la secuencia de la proteína codificada por el gene c-Ha-ras humano y de la proteína Ras1 de levadura, se encontraron en el extremo amino de la proteína de Dras2, 2 aminoácidos extra con respecto a Ha-ras, y en los 90 aminoácidos siguientes la homología es de 80% aprox., tanto con la proteína de Ras1, como con la proteína de Ha-ras. Entre los 7 primeros aminoácidos del tercer exon Dras2 presenta 3 aminoácidos adicionales; en los 80 aminoácidos siguientes la homología es menor, entre 35% y 60%, y a partir del aminoácido 170, prácticamente no existe homología alguna.

ROPERO-JONES, D., SOOLNICK, E. M., COLLIER, R. L., DIBAR, R. 1981.
ras-related gene sequences identified and isolated from
Saccharomyces cerevisiae. Nature 291:767-769.

En el genoma de *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron 7 fragmentos que hibridaban con sondas de ribosomas y eucitinas de mamífero. Se caracterizaron de nueva aplicación ambas secuencias y se observó que existía una gran homología, tanto entre ambos genes como con los genes ras de mamífero así como entre las respectivas secuencias de aminoácidos. Se determinó la secuencia de la proteína de uno de los 7 genes de *S. cerevisiae*, que se comparó con p21 de células de mamífero, proteína 7 aminoácidos en el extremo amino sustrato en p21 de Rousar a partir del aminoácido 9 de leucina y del aminoácido 1 de p21, la homología es notable. Estos datos nos han detectados en *Saccharomyces cerevisiae*, probablemente permitieron estudiar el papel de las proteínas ras en mamíferos.

DIBAR, R., NIETO, A., COLLIER, R. L., ROPERO-JONES, D., SOOLNICK, E. M. 1984. Nucleotide sequence of two rasH related-genes isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Nucl Ac Res 12:3611-16

Se estableció la secuencia de los genes RAS1 y RAS2 del genoma de *S. cerevisiae*, los cuales codifican proteínas cuyo peso molecular es de 40 y 41 kd respectivamente. Ambas proteínas muestran una gran homología en los 170 aminoácidos del extremo amino terminal con las proteínas ras de mamífero, pero en el extremo carbonilo la homología es menor. RAS1 codifica una proteína de 307 aminoácidos y RAS2, una proteína de 322 aminoácidos; la secuencia de los 2 genes tiene una homología total de 48%, y es mayor en el extremo amino, donde de 170 aminoácidos, 120 son idénticos, a diferencia del extremo carbonilo donde sólo coinciden el 29% de los aminoácidos. Estas regiones equivalen a las regiones de homología y divergencia de los genes ras, tanto virales como de mamíferos. Las proteínas RAS1 y RAS2 existen numerosas copias de separación, y tienen 7 aminoácidos adicionales en el extremo amino con respecto a p21 de mamífero, RAS1 tiene además 117 aminoácidos adicionales en el extremo carbonilo y RAS2 tiene 129. Los aminoácidos de las posiciones 12 y 61 de las proteínas de levadura son los mismos de las proteínas proto-oncogénicas ras de mamífero.

SHIBATA, S., HAYASHI, I., KISHIMOTO, A., KIMURA, Y., YAMAMOTO, T.,
KUROKI, S. (1984). Genes for β_2 microglobulin encoding
proteins with domain homologous to the variable region proteins.
Cell 38:697-707.

Existen dos genes en el locus de histocompatibilidad de las genes ras
de mamíferos B2MI y B2MII. La estructura es altamente similar a la
de otras genes y se encuentra que estas codifican proteínas con
una homología de más del 90% en los primeros 80 aminoácidos y en los
siguientes 80 aminoácidos, la homología es de casi el 50% en otros
paralelo con las proteínas con el mamífero. Las proteínas B2MI y
B2MII tienen parte de una homología de 70% en los primeros 80 ami-
noácidos, y a partir de esta posición hay algunas variaciones, de
la misma región donde la divergencia entre algunas proteínas ras
de mamífero es mayor. En general las proteínas B2MI y B2MII tienen
una estructura muy similar a las de mamífero, inclusive las proteí-
nas de β_2 microglobulina son reconocidas por los anticuerpos dirigidos
contra proteínas ras de mamífero.

DEFEU-JONES, D., TAYLOR, A., SHAW, J. F., WOOD, G. y J. HARRIS, B. R. y SCHUBERT, E. H. 1983. Localization and regulation of gene products biological functions in their heterologous systems. Science 220:177-183.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene 7 genes cuyos productos se parecen con muy alta fidelidad a las proteínas ras de mamíferos. La inactivación de estos genes inhibe la viabilidad celular, y la disrupción solo de RAS2 afecta la división celular en medios como el etanol y glicero, pero agregando mayor cantidad de proteína RAS1 a las levaduras, el problema puede solucionarse. Se analizaron las relaciones entre genes ras de ratas, leveduras, de leveduras los genes RAS1, RAS2, y *h-ras*, *v-H-ras*, el proto-oncogene *v-H-ras* huano y un gen híbrido, que se construyó con secuencias de RAS1 y de *v-H-ras*, se insertaron en otros tipos plasmidos, y todos se estudiaron la división celular de levaduras con disrupción en RAS1 y RAS2 y también restringieron la viabilidad celular en etanol y el proto-oncogene *v-H-ras*. Se construyó otro gen recombinante con los primeros 58 aminoácidos de RAS1, y los aminoácidos 48-107 del gen de mamífero con mutación del codón 61 que le confiere oncogenicidad, y también otros 2 recombinantes con los primeros 101 aminoácidos de RAS1 y los aminoácidos 104-107 del gen de mamífero, uno con mutación del codón 59 y otro del codón 61, y los 7 genes construidos transformaron las células NIH-3T3. Incluso otro gen, con delección de 117 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal y mutación del codón 61 formado íntegramente por secuencias provenientes de RAS de levaduras también indujo la transformación de las células NIH-3T3. Esto demuestra que la función de las proteínas ras se ha conservado a lo largo de la evolución en organismos tan distantes como las levaduras y los mamíferos.

NADIN-DAVIS, S. A., NASIM, A., BEACH, D. 1986. Involvement of ras in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *Embo J* 5:2963-2971.

En Schizosaccharomyces pombe existe un gene de la familia ras cuya disrupción no resulta letal, pero causa deformación celular, esterilidad en células haploides y las células homocigóticas ras-esporulan con deficiencias. Se estudió la función del gene ras de S. pombe con alelos de ras activos e inactivos, y con un alelo con mutación del codón 12. El aisló mutante ras-Vall2 inhibió la conjugación, pero no afectó la división celular, ni la esporulación; las células que expresaron un alto nivel del ARNm de ras presentan formas más alargadas, y no mostraron alteraciones en su diferenciación sexual; este fenotipo es muy diferente al observado en células de S. cerevisiae con una mutación equivalente en sus respectivos genes RAS. Estos resultados indican que es muy probable que en la levadura S. pombe la proteína ras no se relacione con la adenil ciclasa como en S. cerevisiae. En las células de S. pombe con el gene ras inactivo, se inhiben la conjugación y la esporulación, en estas células se introdujeron genes ras humanos y se reestableció la actividad sexual, sugiriendo que las proteínas de los genes ras humanos tienen la capacidad de suplir la función de las proteínas de genes ras de S. pombe. Se concluye que en S. pombe, se requiere la función de las proteínas codificadas por los genes ras, para la diferenciación sexual pero no en la división celular, y cabe señalar que aunque los genes ras existen en una gran diversidad de especies, su función no siempre es la misma, aun en especies tan relacionadas como las levaduras S. cerevisiae y S. pombe.

OSINGER, A., GARDNER-WHARF, M., CHANG, R. H., LUKWITZ, D. y SCHIFFER, C. 1968. Assignment of genes rat cellular and oncogenic to chromosomes 1, 4 and X. Mol Cell Biol 1:101-107.

Se considera que el origen de las oncogenes ras virales, fue por la reactivación del genoma viral con el genoma de rata, principalmente en las cruceadas de los proto-oncogenes ras celulares, y por esto es importante determinar sus sitios donde se localizan los proto-oncogenes ras en el genoma de rata. Se ha reportado que en el genoma de rata existe al menos tres genes ras: c-Ha-ras-1, c-Ha-ras-2 y c-Ha-ras aunque este último al parecer no es un gene funcional pues no produce oncogenes virales. Se hicieron hibridas de ratas con células de ratón y de rata y en estas hibridas se segregaron principalmente los cromosomas de rata, y así se determinó que en el genoma de rata, el gene c-Ha-ras está localizado en el cromosoma 4, c-Ha-ras-1 se encuentra en el cromosoma 1 y c-Ha-ras-2 en el cromosoma X.

OLYA, M., WOLFORD, R., DARR, A., DEVEDO-JONES, D., ELLIS, R. M. y SCOUNICK, E. H. 1984. Nucleotide sequence of the two rat cellular ras genes. Mol Cell Biol 4:1706-1710.

En el genoma de rata existen 2 genes homólogos al gene humano c-Ha-ras, también llamados c-Ha-ras-1 y c-Ha-ras-2. Se estudio la secuencia de bases y se encontró que el c-Ha-ras-2 es colinear con el gene H-ras viral, y es un proto-oncogene. c-Ha-ras-1 tiene 4 bases homólogas al gene H-ras viral, es un gene funcional formado por 189 codones que codifican una proteína de 21 kD, prácticamente igual a p21 de H-ras humano pues solo existen 3 nucleótidos distintos entre los genes de rata y humano en los codones 12 y 59 el tercer nucleótido no se traduce en la proteína por lo que solo 2 aminoácidos son distintos entre ambas proteínas. Cabe resaltar que las mutaciones puntuales en estos aminoácidos son las que activan la proteína y considerando que el gene H-ras viral proviene del ADN de rata es mas probable que el gene incorporado haya sido c-Ha-ras-1, pues c-Ha-ras-2 tiene 3 codones que codificarían aminoácidos diferentes de los correspondientes en la proteína viral. En cuanto al gene c-Ha-ras humano existe un 80% de homología pues 57 bases son diferentes en los 2 genes. Existe la posibilidad de que los 2 aminoácidos diferentes hayan surgido durante un proceso de selección artificial en los laboratorios, al llevar a cabo sucesivos experimentos con el virus de sarcoma murino de Harvey con el que se seleccionan las cepas mas transformantes.

HOFFMAN, E. K., TRUSKO, S. P., FEENAN, H., GEORGE, D. L. 1987. Structural and functional characterization of the promoter region of the mouse c-Ki-ras gene. *Mol Cell Biol* 7:2592-2596.

La homología entre los genes ras de humano y ratón es considerable. El gene c-Ki-ras de ratón mide unos 40 Kb, tiene un exón que no se traduce, el exón 0, y otros 5 exones que se traducen en la proteína p21, los 2 últimos exones son alternativos, igual que en el gene c-Ki-ras humano. Para determinar si también existe una homología funcional se estudió la regulación de este gene, caracterizando su región promotora. Se clonó un fragmento de 1100 pb. de la región 5' del gene, en cuya secuencia se encontró un alto contenido de G+C (76%); no se encontró caja TATA ni caja CAAT, pero sí 12 copias de las cajas GC, GGGcGG y CCGCCC. El exón 0 va del codón 150 al 320, el exón 0 tiene una homología de 92% con la región correspondiente del gene humano. En los genes ras de ratón y humano los exones codificantes tienen una homología de 94%, y la gran homología que existe también entre las regiones no codificantes, indica que la función de las regiones no codificantes ha de ser muy importante, y para determinar dicha función se clonó un fragmento con la región no codificante en un plásmido junto con el gene CAT, y se encontró que dicha región funciona como promotor en la transcripción. Los genes domésticos comparten muchas de estas características, como el alto contenido de G+C, y la ausencia de la caja TATA, por ello se concluye que c-Ki-ras ha de cumplir una función muy importante en la rata, y posiblemente también en humanos.

NEMOTO, N., KODAMA, K. I., TAZAWA, A., NASHITO, P., ISHIKAWA, T. 1986. Extensive sequence homology of the goldfish ras gene to mammalian ras genes. *Differentiation* 32:17-23.

Se estudió el genoma del pez dorado hibridando su ADN con la sonda del gene H-ras viral, con la cual se detectaron 4 fragmentos que se clonaron y se determinó la secuencia de ellos; este gen no presenta considerables similitudes con los genes ras de mamíferos. Consta de 4 exones, tiene capacidad para codificar una proteína con un peso molecular de 21 Kd, formada por 193 aminoácidos, de los cuales, 175 son idénticos a los aminoácidos de la proteína p21 del gene c-Ki-ras humana, otros 6 son iguales a los correspondientes de las proteínas p21 de c-Harras y/o N-ras humanos y sólo 2 son diferentes. En total la homología con p21 de c-Ki-ras humano es de 96%, la homología con las otras dos proteínas p21 es menor pero es también significativa. Se encontraron más similitudes: Las uniones entre intrón y exón del gene ras del pez corresponden a los de los genes humanos, el intrón más corto está entre el segundo y el tercer exón de los dos genes, y los aminoácidos 12 y 61 de p21 del proto-oncogene K-ras y del gene ras del pez son idénticos. Con los 4 fragmentos detectados, se hicieron sondas para estudiar el genoma del pez. Se concluye que existen cuando menos 3 genes ras en el genoma del pez dorado.

CONSEJO DE SALUD, EL MUNICIPIO DE MICHIGUAYAN, EL MUNICIPIO DE
SACAPULTEPEC, EL MUNICIPIO DE SAN JUAN, REPUBLICA DE GUATEMALA
problemas durante el desarrollo de Bacteriología Clínica.
Hoy día está 5-25-77.

En la especie Bacteriología Clínica se observaron por tener
una definición de la capacidad funcional en sus procesos de división
celular y diferenciación. De Bacteriología Clínica se replicaron en
diferencia de un promedio de 24 horas, pero sin autoritar los
células de los de división y de la especie. Durante la proliferación
de las células de tipo grande, donde las células se dividen en especies
y células secundarias durante la diferenciación la especie de la
parada propia de la especie. En la Bacteriología Clínica se encontró
un grupo que contiene una muestra de 25 100 células, reproducida por el
antígeno VIT 100 que muestra por muestra por célula de la especie
de con pH de 7.0, el punto de inmersión celularmente como
una proteína producida en el pH que tiene una concentración de
fructuosa de 1. de células en proliferación, la muestra de la misma
cantidad de pH que muestra durante la diferenciación, y se ve
de 10% cuando se llama de la especie, sugiriendo una correlación
entre la especie de la especie Bacteriología Clínica y la diferenciación de
ella, donde posiblemente interviene la función de la proteína res.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

REYMOND, C. D., CORSA, R. H., HENRY, W. C., FINTEL, R. A. 1989. Developmental regulation of a *Dictyostelium* gene encoding a protein homologous to mammalian Ras protein. Cell 57:191.

Dictyostelium discoideum es un protozario con una forma asexual que vive en presencia de nutrientes, pero sin ellas, forma agregados multicelulares, con esporas y células pedunculadas. Las células precursoras, pre-esporas y células pre-pedunculadas se observan a las 12 horas aprox. de que las células han permanecido sin nutrientes, encima de la agregación celular más compacta, y a las 16 horas aprox., los agregados forman pseudoplasmodios, con células pre-esporas en un arreglo espacial específico. Existen genes que se expresan preferencialmente ya sea en las pre-esporas o en las células pre-pedunculadas, uno de estos genes codifica una proteína con un peso molecular de aprox. 24 Kd, homóloga a p21 de mamíferos; el gene Dd-ras. La homología entre p21 de *C-H-ras* de mamífero y la proteína Dd-ras es de 66%; con p21 de *C-H-ras* y *H-ras* es de 65% y con RAS1 y RAS2 de levadura es de 64%. En los primeros 51 aminoácidos de Dd-ras y de p21 de mamífero sólo existen 5 aminoácidos diferentes, y hacia el extremo C la homología disminuye, pero el gene Dd-ras termina con la secuencia Cys₁₀₀Asn, igual que p21. Dd-ras codifica dos transcritos, un ARNm de 700 y otro de 1200 bases, el ARNm de 1200 bases se expresa en células vegetativas y desaparece y se acumula de nuevo, junto con el ARNm de 700 bases, preferentemente, en células pre-pedunculadas. La proteína Dd-ras permanece constante durante el proceso de agregación, y después desaparece. La expresión del gene Dd-ras, puede inducirse con AhaC en células aisladas, sin contacto celular entre sí; el AhaC aumenta el nivel del transcrito de 1200 bases. Estos resultados comprueban que los genes ras cumplen funciones importantes y específicas en la proliferación y diferenciación celular, al menos en algunas especies y es muy posible que también en mamíferos.

REYMOND, C. D., CONER, K. M., NEELIN, D., THEIBERT, A., DEVLIN, P., FIRTEL, R. A. 1984. Phenotypic changes induced by a mutated ras gene during the development of *Drosophila* embryos. *Nature* 313:340-343.

En *Drosophila discoidalis* se encuentra un gen ras, *bd-ras*, cuya proteína se parece mucho a la proteína p21 de mamífero, y es idéntica en las regiones potencialmente transactivantes. Se estudió la función de la proteína *bd-ras*, sugiriendo los efectos del gen *bd-ras* con una mutación del codón 12, equivalente a la mutación que activa los oncogenes ras de mamíferos. La mutación se indujo mediante mutagénesis dirigida en oligonucleótidos, uno permaneció con la Gly-12 normal, y otro se cambió a Thr-12 mutante, y ambos se introdujeron en células de *D. discoidalis*. Las células con el gen *ras-Gly-12* se dividieron originando agregados, con la formación de "picos" sencillos de células, igual que las células normales, pero las células con *ras-Thr-12* mutante, formaron agregados con múltiples picos y no prosiguieron su desarrollo. Las células Gly-12 continuaron su desarrollo formando tallos de agregación como células normales, mientras que las células Thr-12 lo hicieron muy limitadamente. En células con *ras-Gly-12* ocurrió una fuerte selección contra el gen mutante y se verificó que el fenotipo alterado se debió al gen *bd-ras-Thr-12*. En *D. discoidalis*, el AMPc es muy importante en la morfogénesis celular, y regula el proceso de agregación de las células durante el desarrollo, y aunque los fenotipos observados sugieren posibles alteraciones en la vía del AMPc, no se encontró ninguna diferencia entre las células mutantes y las células normales en los niveles de AMPc, de su receptor y de la adenil ciclasa, lo que significa que la alteración probablemente ocurre en otro nivel. Se concluye que en *D. discoidalis*, el gen *bd-ras* interviene en los procesos de diferenciación celular.

MADMOLE, R. y AXEL, R. 1988. A novel ras-related gene family. Cell 41:31-40.

En el genoma del caracol de mar *Aplysia californica* se identificó una secuencia que resultó homóloga a los genes ras, que se llamó gene rho (por ras-homólogo). Se caracterizó el gene rho, el cual tiene capacidad para codificar una proteína de 172 aminoácidos, con un peso molecular de 21 kd, que presenta una homología de 35% con el gene c-Ha-ras humano, 27% con Dera22 de *D. melanogaster* y de 32% con YP2 de levadura; estos dos últimos se consideran los genes menos relacionados con la familia ras. Las regiones de divergencia y homología coinciden con las regiones de estos 3 genes ras humanos y la más homóloga es la que se localiza en el extremo amino hasta el codón 121. Del codón 121 al 140 (122-155 para rho) la divergencia es muy marcada, pero en el extremo carboxilo los 4 últimos aminoácidos conservan la misma secuencia de los genes ras. Se detectó un transcrito de 4.5 kb de rho. Se hizo una sonda con la secuencia de rho para analizar el genoma de rata y humano y en ambos se encontraron secuencias homólogas. En humanos se caracterizaron de manera preliminar las secuencias encontradas y se está haciendo que existan al menos 2 genes rho en humanos; las proteínas que pudieran codificar los genes rho de *A. californica* y humanos, tendrían un 85% de homología, con los primeros aminoácidos iguales y la proteína rho humana tendría una homología de 35% con la proteína p21 humana, por lo que tal vez tengan funciones similares.

ANDERSON, P. S. y LACAL, J. C. 1987. Expression of the *Aplysia californica* rho gene in *Escherichia coli*: Purification and characterization of its encoded p21 product. Mol Cell Biol 7:3620-3626

El gene rho de *Aplysia californica* se parece a los genes ras en estructura nucleotídica y en la secuencia de su proteína, y probablemente también a nivel funcional. Los genes ras tienen características de las proteínas-G y se investigó si también la proteína rho, expresando el gene rho de *A. californica* en el genoma de *E. coli* para estudiar la proteína resultante. Las regiones de homología entre p21 de rho, y p21 de ras, son las que parecen estar involucradas en la capacidad de unirse a GTP/GDP (codones 5-21, 37-64, 109-120, y 141-170), si bien la gran divergencia en otras regiones posiblemente indique que las funciones de las 2 proteínas son distintas. La proteína p21-rho mostró actividad de GTPasa aunque bajo diferentes condiciones bioquímicas que p21-ras. La afinidad por GTP/GDP fue de 5 a 10 veces menor en p21-rho, que en p21-ras, y la especificidad por GTP fue menor a la especificidad por GDP en p21-rho. La afinidad por GDP/GTP, y la función de GTPasa son características de las proteínas-G, por lo que se concluye que la proteína p21 codificada por el gene rho, tiene capacidad para funcionar como proteína-G, aunque su función específica probablemente no sea igual a la de p21 de los genes ras.

LOWE, D. G., CAMON, D. J., DELWANT, E., SAKAGUCHI, A., W. HAYLER, S. L., GUEDEL, D. V. 1984. Structure of the human and murine K-ras genes: novel genes closely related to ras protooncogenes. Cell 38:137-43

Los genes ras son muy importantes, por lo cual se examinó el genoma humano con una sonda de v-Ha-ras, en relaciones tales que la sonda permaneciera unida a fragmentos no muy homólogos y se detectó un gene, que se llamó K-ras ("Related-ras"). El gene K-ras tiene 6 exones, mide aprox. 5 Kb, tiene en las primeras 1000 nucleótidos una caja TATA y 4 cajas GC, sus 6 exones varían en tamaño, de 27 a 51 codones, codifica una proteína de 218 aminoácidos, con un peso molecular de 23.4 Kd, y una homología de 53% con p21 del gene c-Ha-ras humano. Asimismo, se aisló y caracterizó K-ras del genoma de ratón, que resultó tener una homología de 82% con el gene humano, y una homología de 79.5% con la proteína K-ras humana. La estructura intrón-exón de K-ras no coincide con la de otros genes ras, pero la posición del primer intrón de K-ras resultó idéntica con respecto a otros dos genes: furax540 de *D. melanogaster*, y Dc-ras de *D. discoideum*. Se determinó que K-ras se localiza en el cromosoma 19 humano y en el cromosoma 7 de ratón. La principal diferencia entre las proteínas de los genes K-ras, Ha-ras, Ki-ras y H-ras, es un fragmento de 26 aminoácidos en K-ras, en el extremo amino terminal, que no presentan las otras proteínas, pero se les sirven las regiones de unión a GTP y la región carboxilo terminal, lo que indica que la función de la proteína de K-ras ha de ser similar a la de p21ras.

CHARDIN, F., TAVITIAN, A. 1985. The raf gene: a new ras related gene isolated by the use of a synthetic probe. Embo J 3:2203-08

Mediante un oligonucleótido con la secuencia de los aminoácidos más conservados entre los distintos genes ras (posiciones 57-63) se encontró un gene relacionado con los genes ras, que se llama raf (ras-like) en linfocitos de cisne no transformados, pero inmortalizados con el virus Epstein-Barr. El gene raf tiene capacidad para codificar una proteína de 206 aminoácidos con un peso molecular de 23.3 Kd, que con las proteínas p21 de los genes humanos c-Ha-ras, c-Ki-ras y H-ras, tiene una homología en general de 52%. El gene raf presenta las secuencias que codifican las regiones de unión a GTP en la proteína, así como la secuencia del extremo carboxilo terminal, que en p21 de ras determina su unión membranal, y se concluye que la proteína raf probablemente también es una proteína localizada en la membrana celular, y su función raf vez sea también similar a la función de p21 de ras.

SCHEFFER, P., GONZALEZ, J., GONZALEZ, F., 1987. A yeast gene encoding a protein homologous to the human α -tubulin protein catalogue product. Nature 326:704-707.

Las secuencias antigénicas existen en diversas especies, por lo que es posible estudiarlas en organismos que, de por sí, constituyen un medio adecuado a las investigaciones con los seres orgánicos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se estudió en un mosá y se encontró un gen homologo al gen humano de tubulina el cual se llama YPT1. Este gen se localiza entre los genes de actina y tubulina en el cromosoma VI del genoma de *S. cerevisiae* y se difiere una proteína de 200 aminoácidos, con un peso molecular de 25 Md apud. Se compararon las secuencias de las proteínas YPT1 y P α 1 de los genes de humanos, y se encontró una homología de 33% entre las secuencias YPT1 de YPT1 y las aminoácidos 4-165 de P α 1. La divergencia entre las proteínas p α 1 y YPT1 se localiza en la región que normalmente presenta mayor divergencia entre las diferecias proteínas. Como se ignora cuál sea la función de YPT1 en *S. cerevisiae*, pero considerando que la región de YPT1 que presenta homología con p α 1 es la región importante para la actividad por su extremos de quinas es posible que la proteína YPT1 también tenga esta actividad, y su función puede ser similar a la de p α 1- γ s.

SCHMITT, H. G., BRONNER, J., PERSCH, E. y GILBERTZ, E. 1988. The yeast-related YPT1 gene product in yeast: A GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. Cell 57:401-408.

El gene YPT1 de *Saccharomyces cerevisiae*, antes llamado YPT2, tiene una homología de 33% con las proteínas p α 1 humanas. El que en levaduras la disrupción de los genes KAS1 y KAS2 es letal indica que la proteína YPT1 no puede complementar la función de los 2 genes KAS, y que la función de la proteína YPT1 ha de ser diferente. Para definir su función, en especies se inactivó al gene YPT1 que se desarrollaron, y algunas se dividieron una o dos veces, lo cual no ocurre al inactivarse KAS1 y KAS2. El promotor GAL10 que es activo en un medio con galactosa se insertó cerca de YPT1 en células que se dividieron normalmente con galactosa, pero con glucosa el promotor se inactiva y la división empezó a detenerse hacia las 11 horas, las células presentaron un tamaño mayor que las células normales, y algunas presentaron formas trilobuladas; en presencia de galactosa, volvieron a la normalidad. La organización de los microtubulos mostró una vez más alteraciones mientras más tiempo permanecieron las células con YPT1 inactivo, y se comprobó que los genes de beta-tubulina y actina localizados a ambos lados del gene YPT1 no intervienen en las alteraciones fenotípicas. Es evidente que existe una correlación entre YPT1, y la organización de los microtubulos, y para caracterizarla se estudió la proteína YPT1, que conserva las regiones de unión a GTP/GDP, incluyendo al codón 121, y se demostró que conservan dicha afinidad. Se indujo una mutación puntual en el codón 121, que resultó letal para las células. La proteína YPT1 con la mutación en el codón 121 perdió la afinidad por GTP. Se concluye que en *S. cerevisiae*, la proteína YPT1 participa, directa o indirectamente en la organización de los microtubulos, y por lo tanto, en el fenotipo celular.

NIEMI, J., HANSON, E. G., TAYLOR, L. A., and GIBSON, M. 1985. The YPT1 protein coded by *Saccharomyces cerevisiae* has homology to yeast ras proteins. Proc Natl Acad Sci USA 82:3347-3350.

Los genes ras de levadura se han descubierto en muy diferentes especies de hongos filiciales y en este trabajo se detecta por primera vez el gene ras1 en los genes ras en el genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, que se llama ras que era, por E. coli transformaciones. El gene ras1 se localiza muy distalmente después del gene de la calcitonina YPT hacia el extremo 3', y tiene capacidad para sintetizar una proteína de 213 aminoácidos. Se comparó la secuencia de la proteína del gene ras1 y la proteína de los genes RAS de levadura y se encontró una homología de 41% en los 197 primeros aminoácidos de la proteína RAS1, y de 42% con la proteína de RAS2, y a pesar de estas similitudes se encuentran la misma urgencia que en todas las proteínas ras, pero se conservan los últimos aminoácidos. La proteína del gene ras1 tiene afinidad por nucleótidos de guanina igual que las proteínas ras levadura. Estos resultados indican que los genes ras se originaron en etapas muy tempranas en la evolución, pues también se encuentran en procariontes y se han conservado por millones de años.

TOUCHOT, N., CHARDIN, P. y TAVITIAN, A. 1987. Four additional members of the ras gene superfamily isolated by an oligonucleotide strategy: Molecular cloning of YPT1-related cDNAs from a rat brain library. Proc Natl Acad Sci USA 84:3310-3314.

Las proteínas de la familia ras comparten regiones muy semejantes que son iguales, y tienen otras regiones variables. En especial la secuencia Asp-Thr-Gln-Gly-Gln-Gln en las posiciones 57-62 de ras1 ras está muy conservada, además de que no existe en ninguna otra proteína conocida, ni siquiera en las proteínas G y puede considerarse exclusiva de los genes ras, y si existen otros genes ras probablemente codifiquen esta peptida pero existen 512 secuencias nucleotídicas que lo codifican, por lo que se hicieron diversas combinaciones con varias secuencias nucleotídicas hasta encontrar la combinación que detecta todos los genes ras conocidos con dicha combinación, se usó una librería genómica de cerebro de rata, y se detectaron 4 genes que codifican al péptido, llamados rab1, rab2, rab3 y rab4 (por ras-brain). Se caracterizaron estos genes. El gene rab1 tiene capacidad para codificar una proteína de 205 aminoácidos con peso aprox. de 23 kD, con una homología de 75% con la proteína YPT de la levadura. El gene rab2, codificaría una proteína de 213 aminoácidos, con 23.4 kD aprox., de peso molecular, y homología de 83% con YPT; rab3 y rab4 no presentan regiones codificantes definidas. Entre las regiones conservadas están las de afinidad por GTP/GDP. Se concluye que estos genes posiblemente estén relacionados con los genes ras y que rab1 tal vez sea el equivalente del gene YPT de levaduras en mamíferos.

SUCCI, C., FRONZIO, R., CHIARIOTTI, L., BROWN, H. L., RICHIERI, H. H., BRONZI, G. et al. 1986. A new member of the ras gene superfamily cloned from rat liver cells. *Mol Cell Biol* 6: 1411-1417.

En la línea celular IMR-90 de hígado de rata, se encontró un nuevo gene de la familia ras, al analizar la biblioteca genómica de estas células, con la sonda de ADN con un fragmento del factor de crecimiento similar a insulina (IGF-1), que originalmente se estaba estudiando. Con esta sonda se detectaron y aislaron diversos fragmentos, se secuenciaron y ninguno de ellos resultó parecido al R16F-11, pero uno de los fragmentos presentó ciertas similitudes con los genes ras, y se le llamó gene BRL-ras. Se caracterizó el gene BRL-ras y se encontró que tiene capacidad para codificar una proteína de 201 aminoácidos, que tendría un peso molecular total de 22.8 Kd, cuya secuencia tendría una homología de 30-35% con las proteínas p21 de ras, conservándose las regiones para la unión a GTP y la región carboxilo terminal. Se elaboró una sonda con la secuencia de este gene, con la que se detectaron genes BRL-ras en diversas muestras de tejido y líneas celulares de rata, indicando que el gene BRL-ras forma parte del genoma normal de rata.

SCHROEDER, H. C., RICHINO, Y., GRANZOW, M., RONELDO, S., FRIESE, U., UHLENBUCK, G., MULLER, W. E. G. 1986. Induction of ras gene expression by homologous aggregation factor in cells from the sponge *Geodia cydonium*. *J Biol Chem* 261:16334-16340.

Las esponjas tienen una organización celular muy sencilla pero con cierto grado de especialización celular, lo que facilita estudiar los mecanismos de interacción entre célula y célula, que permiten a las células situarse en su lugar funcional. Se han reportado en *Geodia cydonium* dos tipos de moléculas que participan en el contacto inicial especie-específica de las células, el factor de agregación (AF) y el receptor de agregación a la base. Para que las células se sitúen en su lugar funcional, actúan 2 grandes sistemas de interacción célula-matriz, que involucran al factor de unión colágeno-colágeno, y al factor de anti-agregación a lectina. En *Geodia cydonium* este proceso se efectúa cuando el AF se une al receptor de agregación unido a membrana viva, después se estimula el metabolismo de fosfatidilinositol, y se inicia la síntesis de ADN. Se detectaron en *Geodia cydonium* proteínas codificadas por genes similares a los genes ras, que se activan al unirse al AR con AF; la proteína ras se asocia a membrana y se une al receptor de lectina. Después de que se expresa ras, las células son accesibles al agente mitógeno que induce su división. Aún no se detectó el gene ras como tal, pero sí las proteínas que codifica, se caracterizaron y se determinó que tienen un peso molecular aprox. de 23-26 Kd, presentan afinidad por GTP, y son homólogas a las proteínas p21 de los genes ras de mamífero. Se concluye que las proteínas ras de *Geodia cydonium* participan en los procesos de división celular y de interacción entre célula y célula.

ZAMM IONIS, C. MELDEN, G. M. ARNOLD, R. D. SCHUMBER, R. D. 1981. Detection of proto-oncogenes in birds. *J. Cell Biol.* 103:103.

Los oncogenes relacionados participan en la regulación de división y diferenciación celular y se encuentran en muy diversos organismos tanto animales como vegetales. En estos últimos se ha estudiado de tanto por lo que se investiga en aves, que similares, que participan también en la división y diferenciación, en una planta que tiene gran importancia económica y que se ha estudiado ampliamente a nivel genético. La planta de café *Coffea arabica*. Se generó un banco con un tipo de orígen animal de los oncogenes *v-src*, *v-fes*, *v-Ha-ras*, *v-Myc*, *v-abl* y *v-yes* y se detectaron varios fragmentos, que de los cuales hibridó con la sonda de *Ha-ras* y el otro hibridó con *v-Ha-ras*. Se hizo un estudio transcriptómico y se encontraron dos transcritos de *v-Ha-ras*. Los otros fragmentos que se detectaron correspondieron a la sonda de los oncogenes *v-yes* y *v-abl* y no se detectó *v-fes*. Mucho más se comprende que los oncogenes deben ser los fragmentos que se han conservado durante millones de años, en muy diversos organismos.

FRANKSH, K., SELIGY, V. L. 1985. Oncogenes related sequences in fungal kinases of some leucins. *Biochem Biophys Res Com.* 133:271.

Se han reportado y caracterizado genes homólogos a los oncogenes de mamíferos en dos especies de levaduras, *S. cerevisiae* y *S. pombe*, por lo que se investigó la presencia de genes similares en otras especies de hongos, y en diversas especies se detectaron secuencias homólogas a los oncogenes de mamíferos *src*, *abl* y *mos*. Con la sonda del gen *v-Ha-ras* se detectaron varias secuencias en *Aspergillus niger* y *Ceratocytis ulmi*. En *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus niger*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Schizosaccharomyces castellii*, *Schizosaccharomyces occidentalis* y *Schizosaccharomyces pombe*, se detectaron secuencias (de 1 a 3) y con poca intensidad, pero en *Pichia stipitata*, *Ceratocytis ulmi*, *Schizosaccharomyces alluvius*, *Saccharomyces cerevisiae*, las secuencias se detectaron con mayor intensidad, aunque también fueron escasas. Con una sonda del gen *src* de *S. cerevisiae* se detectaron con escasa intensidad, secuencias en *S. pombe*, *S. castellii*, *S. alluvius* y *S. pombe*. Los genes *src* y *abl* se detectaron en *S. cerevisiae*, *S. alluvius*, *S. pombe*, *S. castellii* y *S. pombe*. También hubo hibridación con una sonda del gen de actina, el cual está muy conservado en la evolución. Se concluye que es muy posible los oncogenes, en especial *src*, existan en mayor número de especies que el reportado hasta el momento.

CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS RAS

Como se ha expuesto a lo largo del texto, el producto de los genes ras son proteínas llamadas así, que el p21. La gran similitud que hay entre las proteínas de los genes Ha-ras, K-ras, y N-ras es por lo que estos genes se consideran miembros de una sola familia. Los importantes descubrimientos obtenidos al estudiar las proteínas RAS de levaduras han constituido un gran avance, y en este capítulo lo se tratan dichos descubrimientos, sin embargo aun se desconoce la función de las proteínas p21 en el metabolismo celular normal, y menos aun se sabe como es que estas proteínas participan en los procesos tumorigénicos, pero su función en células normales, cual quiera que sea, seguramente está muy importante, dado que existen en un gran número y variedad de especies, en todo tipo de células tanto en células normales de todo clase de tejidos, como en células malignas de diversas neoplasias y de líneas establecidas, por las similitudes de las proteínas ras y por la estrecha relación de los genes ras, los cuales presentan las características de los genes ras normales e importantes en la célula.

Aunque se desconoce la función concreta de las proteínas ras en la maquinaria celular, se han descrito algunas de sus características bioquímicas y estructurales, como son su localización en la membrana citoplasmática, su procesamiento post-transcripcional su actividad de autoactivación, de GTP-asa y su afinidad por nucleótidos de guanina. Entre sus otras actividades, así como la localización membranar, también se presentan en las proteínas-p21, cuya función es llevar una cierta señal a través de la membrana. Posiblemente esta también sea la función de p21, como se describirá a continuación.

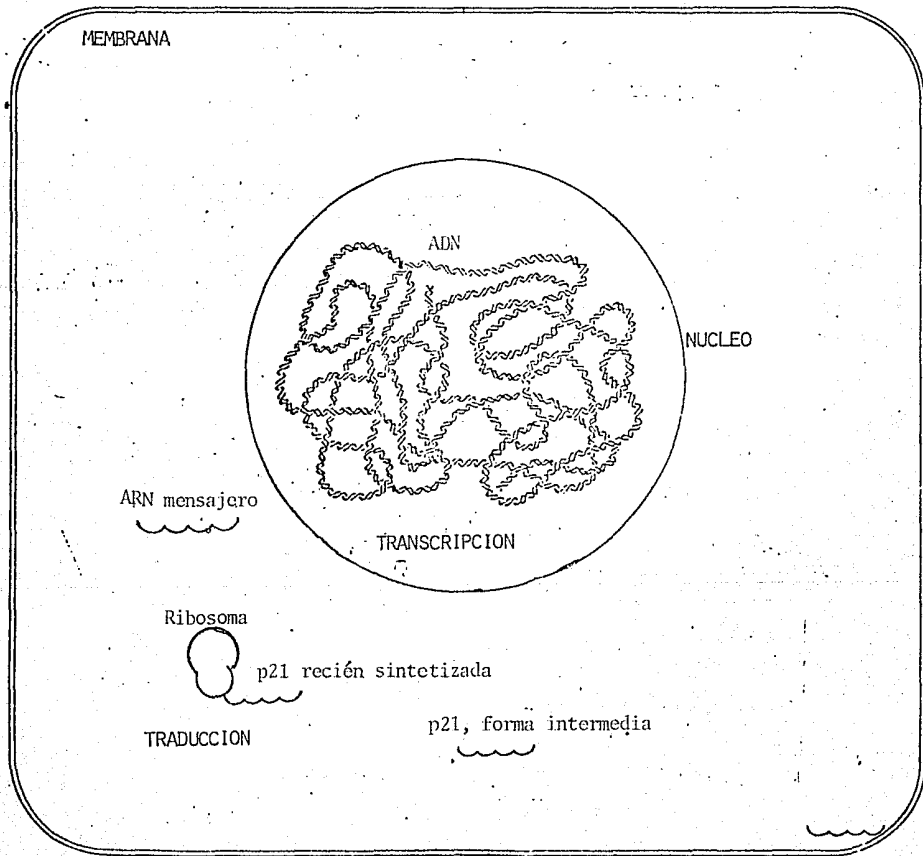
CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y ESTRUCTURALES DE P21

En la célula, p21 se localiza en la superficie interna de la membrana citoplasmática y se encuentra en forma de complejo lipoproteico, asociada al ácido palmítico. La unión al lípido es lo que determina que p21 se fije en la membrana (Soften y cols., 1982), que es indispensable para la capacidad transformante de p21, pues las proteínas p21 con subsecuencias puntuales oncogénicas, si no están unidas al ácido palmítico, no inducen transformación (Suas y Soften, 1984).

En *S. cerevisiae* las proteínas RAS reciben póst-traducción se sujeta a un procesamiento post-traduccional que consta de 3 pasos: Proteína precursora - proteína procesada - complejo lipoproteico. (Fujiyama y cols., 1987). En células de mamíferos se lleva a cabo un procesamiento de las proteínas ras, que en general es muy similar, aunque se desarrolla más lentamente (Iacconi y cols., 1988).

Una vez procesadas las proteínas ras, presentan las siguientes características:

FIGURA 7
PROCESAMIENTO DE LA PROTEINA P21



p21 unida a membrana, forma final

ACTIVIDAD DE GTPasa

La principal diferencia entre las proteínas p21 normales y aquellas de la superclase de protooncogenes de p21 ras, radica en la capacidad de autorregulación de p21 ras, ausente en p21 celular. Esta capacidad está dada por la capacidad de inactivarse al codón 67 en p21 ras, clasificándose en dos clases de tipo fosforilable, las cuales poseen la capacidad potencial para inactivarse. Se demostró lo anterior estudiando en proteínas activadas de una mutación del codón 61 de un espécimen oncogénico humano, y con p21 protooncogénica y con las genes correspondientes a las dos proteínas se induce por mutación de la proteína normal a través en el codón 67, y ambas proteínas se autorregulan en la leucemia (McGrath y cols., 1981).

Solo se han observado dos posibles sustratos fosforilables por proteínas p21-ras, dos proteínas intracelulares con peso molecular de 35 Kd. y 17 Kd.; en la regulación de la fosforilación de ambas están involucradas proteínas p21, p21 ras, y probablemente se interviene en la estimulación de la fosforilación de la proteína de 35 Kd. y en la inhibición de la fosforilación de la proteína de 17 Kd., mientras que p21 oncogénica participa en la inhibición de la fosforilación de las dos (Gashin y Weinstein, 1982).

ACTIVIDAD DE GTPasa

Las proteínas p21 tienen la capacidad para hidrolizar al GTP principalmente p21 protooncogénica, pues la actividad de GTPasa de p21 oncogénica es menor (McGrath y cols., 1982, ver pag 99). p21-ras normal funciona como GTPasa con una eficiencia de 5 a 10 veces mayor que p21 activada mediante una mutación en el codón 12 o con 2 mutaciones, en los codones 12 y 67, sin embargo p21 oncogénica con mutación del codón 67 presenta la misma actividad que p21 normal. La disminución en la actividad de GTPasa al parecer no es indispensable para la función transformante de p21 (Local y cols., 1982), pues las proteínas p21 con una mayor o menor disminución en su actividad de GTPasa tienen la misma capacidad transformante, así que existe una correlación entre ambas actividades (Trahey y cols., 1987); lo anterior indica también que el aminoácido 12 parece estar involucrado en la actividad de GTPasa. En el codón 61 de células de mamíferos, se han inducido mutaciones con 17 aminoácidos distintos y en todos los casos se han obtenido proteínas con una actividad de GTPasa disminuida entre 3 y 10 veces en relación con p21 normal, sin cuando con 3 de ellos se obtuvieron proteínas sin actividad oncogénica (Ger y cols., 1985a). Cabe resaltar que las proteínas Ras de *S. cerevisiae* también presentan actividad de GTPasa, y que en las proteínas Ras de levaduras con una mutación equivalente a la que activa p21 de mamíferos, la actividad de GTPasa está también disminuida (Imaizumi y cols., 1983).

AFINIDAD POR NUCLEÓTIPOS DE GUANINA

Las proteínas p21 tienen la capacidad de unirse a los nucleótidos de guanina GTP y GMP, así como al nucleótido-energético, como lo sugiere la genética con mutaciones en el locus *ras*. En el primer estudio de la función de la base de las dos actividades bioquímicas mencionadas, se pudo demostrar que la afinidad por GTP y GMP de la proteína p21 normal es similar a la de las proteínas Ras de la familia Ras de G. Las mutaciones rasón presentan afinidades por GTP y GMP (Tomaso y cols., 1985, ver pag 102). La región que participa directamente en la afinidad por nucleótidos de guanina, comprende a los aminoácidos Met-115, Tyr-117, y Asp-119; las mutaciones con aminoácidos puntuales en estos sitios con mayor afinidad a GTP/GMP sin que se altere su capacidad de liberar y unir, (1985). La afinidad por ambos nucleótidos generalmente es la misma, pero se ha reportado una p21 mutante con ras en lugar de Ser normal en la posición 17, con mayor afinidad por GTP que por GMP, lo cual altera el lugar de unión y repercute en la inhibición de la proliferación de las células que expresan la p21 mutante (Fung y Cooper, 1983).

En la proteína p21 las regiones de los aminoácidos 107-111 y 120-125 participan directamente en la afinidad por nucleótidos de guanina pues la unión de uno o más de estos aminoácidos ocasiona la pérdida de la afinidad por GTP/GMP pero no la capacidad de este indica que la unión a GTP/GMP tal vez sea necesaria, pero no suficiente, para desencadenar el proceso transformante. En *Xenopus*, con las proteínas con mutaciones que disminuyen su afinidad hasta 100 veces respecto a p21 normal, siguen uniendo GTP y GMP (Fung y cols., 1985). Esto tal vez pueda explicarse en función de la capacidad total de GTP y GMP en la célula, que si es mayor que la capacidad total de p21, los nucleótidos se pueden seguir uniendo por saturación, incluso a una proteína con mínima afinidad o bien, a que la cinética de la reacción sea tal vez más importante que la afinidad en sí, esto es, que en la célula la función de p21 tenga que ver más con el hecho de que permanezca unida a GTP o GMP, por un determinado tiempo, que con la afinidad con la que haya ocurrido la reacción. En todo caso, los datos obtenidos en estudios *in vitro* aunque válidos, no siempre permiten explicar fácilmente lo que realmente ocurre en un organismo vivo.

REGIONES DE LA PROTEÍNA p21

La proteína p21 puede dividirse en 3 grandes regiones:

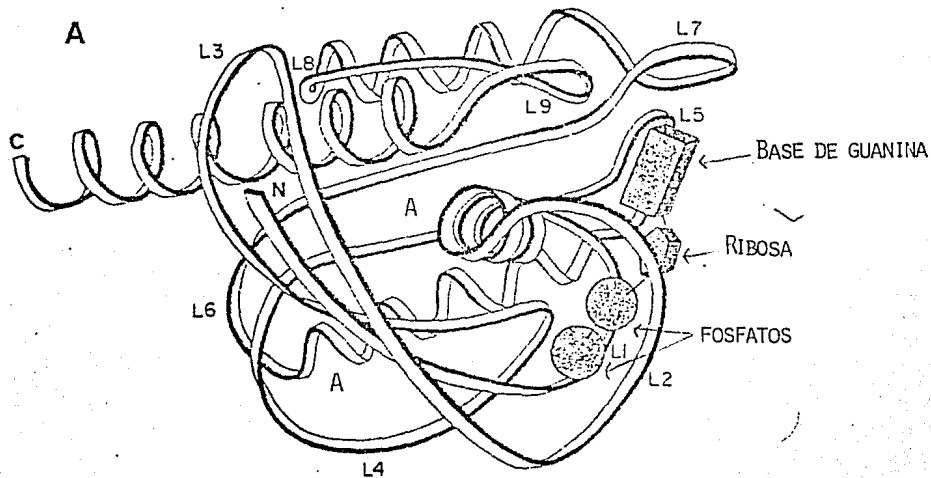
El extremo carboxilo, en especial los 4 últimos aminoácidos, que intervienen en la unión lipídica, y en la localización membranal de la proteína.

La región intermedia donde ocurre la mayor divergencia entre distintas proteínas Ras; comprende aprox. 20 aminoácidos en mamíferos, aunque en otras especies el número varía, y no es esencial para la transformación.

ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE p21

Existen relativamente pocas proteínas con relación con GTP y GDP, y entre las más conocidas está el factor de elongación bacteriano EF-II cuya estructura tridimensional se ha tomado como base para explicar las propiedades bioquímicas de p21 (Jurnak, 1985). En la secuencia de otras proteínas-S existen regiones similares a ciertas regiones equivalentes en p21, que portan con el sitio activo de las proteínas-S, donde se unen GTP y GDP (Lodras y cols., 1985). p21 es la primera proteína oncogénica cuya estructura tridimensional se ha descrito, lo que ha permitido entender más con respecto a sus sitios activos. p21 es una proteína pequeña, de forma compacta, con 4 hélices de helix-pirrola, 3 alfa bucles y 7 las pontas de interconexión ("loop"): en el loop 1 se sitúan los residuos (aminoácidos 10-150), en el loop 2, la ribosa; el loop 7 (aminoácidos 116, 117, 118, y 120), y el loop 9 (aminoácidos 145-147) rodean la guanina y en el loop 1 está el sitio de hidrólisis de GTP. En la estructura de p21 se observan varios sitios expuestos, donde podría unirse a posibles moléculas efectivas (De Vos y cols., 1985).

FIGURA 8
ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA PROTEINA P21-ras



A - ALFA HÉLICES

C - EXTREMO CARBOXILO TERMINAL (COOH)

N - EXTREMO AMINO TERMINAL (NH₂)

L1 - L9 - LOOPS DE INTERCONEXIÓN NUMERADOS EN DIRECCIÓN NH₂ - COOH

BANDAS CONTINUAS - BETA PLEGADAS

SEFTON, B. M., ROBERTSON, I. B., CAMPBELL, J. H., SCHLICK, E. M.
1982. The transforming proteins of nude sarcoma virus Harvey
sarcoma virus and Abelson virus contain tightly bound lipid.
Cell 31:463-74

Las proteínas oncogénicas de 3 virus tumorigénicos, el virus de sarcoma de nude, (proteína oncogénica pp60-*src*), el virus de Harvey (p21-v-Harvey) y el de Abelson (p210-*src*) tienen actividad de cinasas. En la célula, pp60-*src* y p21 se encuentran en la membrana citoplasmática y p210 parece tener la misma localización, pp60-*src* y p21, cuando están recién sintetizadas, son proteínas solubles, y su secuencia de aminoácidos carece de las regiones típicas de las proteínas de membrana, y es posible que su localización membranaral se deba a alguna modificación post-traduccional como la unión lipídica, que es el caso de ciertas proteínas membranarales ya ya fijación membranaral requiere de su unión a un lípido, como el receptor de transferrina, unido al ácido palmítico. Para averiguar lo se transformaron células humanas con el virus de Harvey, se ag trajo la proteína p21 y el receptor de transferrina y se marcó el ácido palmítico radiactivamente para se observar su incorporación tanto a p21 como al receptor de transferrina. No se detectó ácido palmítico radiactivo unido al precursor de p21 (pro-p21), pues p21 en su forma precursora no se une a la membrana, por lo que p21 p_{reg} cesada, que es cuando se une a la membrana, sí ha de requerir unir se al ácido palmítico. De esta forma se determinó que las proteínas pp60-*src* y p210 también se unen a ácido palmítico. La unión proteína-lípido debe ser determinante para la localización membranaral de p21, pp60-*src* y p210 y por lo tanto, ha de ser fundamental para que estas proteínas ejerzan sus funciones transformantes.

BUSS, J. E., SEFTON, B. M. 1986. Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21-*src*. Mol Cell Biol 6:116-122.

La proteína p21 forma un complejo lipoprotéico. Se estudió al lípido unido a la proteína y se comprobó que es el ácido palmítico, el cual se encontró unido en el extremo carbonilo de p21, al parecer en la cisteína-186. Se determinó que la unión proteína-lípido es un evento post-traduccional. Se transformaron células con p21 oncogénica, desprovista del ácido palmítico, y se observó que sin el lípido, p21 pierde su capacidad oncogénica. Todas las proteínas p21 estudiadas, tanto virales como celulares, se encontraron en forma de complejo lipoprotéico.

FUJIMORI, A.; HATSUBUCHI, K.; IMAHORI, S. 1987. A novel yeast mutant defective in the processing of ras proteins: assessment of the effect of the mutation on processing steps. EMBO J 6:123-8.

Las proteínas RAS de levaduras son muy parecidas a las de mamíferos estructural y funcionalmente; las proteínas RAS se sintetizan en el citoplasma como precursoras, se convierten rápidamente en proteínas procesadas, que por último se unen ya sea a ácido palmítico o mirístico, y se fijan a la membrana. Se determinaron los mecanismos de biosíntesis y procesamiento de proteínas RAS induciendo mutaciones para obtener una cepa deficiente en la biosíntesis de RAS y la cepa mutante obtenida se llamó *dpr1* ("defective in the processing of ras proteins"). Se estableció que la alteración de *dpr1* consiste en un solo gene, *DPR1*, el cual no está asociado al gene *RAS2*. Las mutantes *dpr1* mostraron un fenotipo estéril característico, una gran cantidad de proteína precursora, sus proteínas RAS se acumularon en el citoplasma, y hubo pocas proteínas en la membrana, comparadas con las levaduras normales. La mutación no afectó la unión al lípido, indicando que la forma precursora necesita convertirse en la forma procesada para unirse al lípido. El procesamiento de las proteínas RAS es muy rápido, lo que ha dificultado su estudio, pero en estas mutantes fue posible determinar que la forma precursora comparada con la forma procesada no carece de fragmentos grandes de aminoácidos, y también se une a GDP. La esterilidad es por la carencia de una proteína necesaria en la conjugación sexual, el factor α , cuyo procesamiento post-traduccional es probablemente como el de las proteínas RAS. Falta definir con precisión la biosíntesis y procesamiento de las proteínas RAS, pero puede afirmarse que consta de 3 pasos: Proteína precursora, proteína procesada y proteína unida a ácido palmítico

TAMANDI, P., HSUEH, E. C., GOODMAN, L. E., CURTIS, B. R., BETRICK, R. J., BRENNI, M. R., LITVIN, A. 1986. Post-translational modification of ras proteins: detection of a modification prior to fatty acid acylation and cloning of a gene responsible for the modification. *J Cell Biochem* 32:212-223.

Las proteínas ras se sintetizan como polipéptidos libres, trabajándose después por el citoplasma para situarse en la membrana, a pesar de que carecen de secuencias específicas para fijarse en la membrana, presentes en otras proteínas membranales; el lípido parece ser responsable de dicha fijación. El procesamiento de p21 de c-Ha-ras humano es similar al de RAS de levaduras, pero es más lento y permite registrarlo mejor, por lo que se hizo una combinación: Se clonó c-Ha-ras en un plásmido con un promotor fuerte, se expresó en levaduras y se siguió la trayectoria de p21 marcada por diactivamiento. Se observó que del ribosoma sale la forma precursora, recién sintetizada, que viaja a través del citoplasma donde se convierte en la forma intermedia, y después se une al ácido palmítico y a la membrana, convirtiéndose en la forma final. Se trata de dos eventos distintos, aunque relacionados, como se observó en las levaduras con mutación en el gen *up1*, en las que se bloquea el paso de proteína precursora a proteína intermedia y se reduce la cantidad de proteína final, indicando que el primer paso es obligatorio para que ocurra el segundo. Se indujo una mutación de serina por la cisteína-105 normal, que es el sitio de unión al lípido, y no se detectó el complejo lipoproteídico, tampoco la forma intermedia. El gen *up1* de levaduras es importante para estudiar su relación con el procesamiento de las proteínas ras, que al parecer es muy similar al procesamiento de las proteínas de mamífero, aunque falta establecer la naturaleza de este procesamiento. Se concluye que el procesamiento de las proteínas p21 de humanos, sigue una secuencia que es: Proteína precursora - proteína intermedia - unión a ácido palmítico.

MURRAY, J. P., LARSON, D. J., COEDDILL, D. V., LEVITSKY, H. W.
1984. Comparison of oncogenic properties of normal and activated
human ras p21 protein. Nature 312:442.

Se estudió la proteína del gen c-Ha-ras humano, del oncogeno, y del proto-oncogeno, comparando las características bioquímicas de ambas, creciendo el CHO humano en un plásmido introducido con E. coli para obtener gran cantidad de p21. Se indujo una mutación dirigida en el codón 35, de alanina a treonina, y se detectó actividad de autocinasa, similar a la observada en la proteína viral, que en esto se diferencia de la proteína celular. La mutación se indujo en la proteína proto-oncogénica y en la proteína con mutación del codón 12 que la hace oncogénica, pero registró se diferencias en la reacción de fosforilación no se detectó otro sustrato fosforilado por p21 más que ella misma. Con 515 marcadora radiactivamente, se midió la afinidad de p21 normal y la transformada con mutación del codón 12, y en la proteína con mutaciones en los codones 12 y 35 dicha afinidad disminuyó notablemente. p21 muestra actividad de GTPasa pero en p21 con mutación del codón 12, esta actividad es marcadamente menor que en p21 normal, que es una importante diferencia, probablemente relacionada con la oncogenicidad.

BACKER, J. M., WEINSTEIN, I. B. 1984. p21 ras proteins and guani-
ne nucleotides modulate the phosphorylation of 36- and 17-kilodal-
ton mitochondria-associated proteins. Proc Natl Acad Sci 81:3307

Las proteínas ras son similares a las proteínas-G, tanto por su localización membranal como por su afinidad por GTP y GDP y su actividad de GTPasa. p21 viral se autofosforila, mientras que en la proteína celular no se presenta esta actividad, para carecer de la treonina-59, donde se fosforila p21 viral, y no se ha descrito otro sustrato fosforilado por p21 más que ella misma. Se investigó la existencia de más sustratos fosforilables por p21, producción de *Escherichia coli*, p21 de diversos orígenes: p21 de c-Ha-ras humano, del mismo pero con mutación del codón 12 (H2-ras) y de su ras pero con mutación en el codón 35 (H3-ras). p21 viral requiere un sustrato fosforilable de GTP como donador de grupos fosfato, para que se pueda dirigir por la-GTP, para que la fosforilación resulte la más rápida sólo a p21. Se encontraron dos proteínas cuyo peso molecular es de 36 y 17 Kd en mitocondrias de hígado de rata, que en presencia de las diferentes p21, presentaron distintos comportamientos. La proteína normal estimula la fosforilación de la proteína de 36 Kd, e inhibe la fosforilación de la proteína de 17 Kd, mientras que ambas proteínas oncogénicas inhiben la fosforilación de las 2 proteínas mitocondriales. Se ignora si p21 fosforila, o si sólo participa de manera indirecta, pero las diferencias encontradas tal vez se relacionen con la oncogenicidad de p21.

LACAL, J. C., SRIVASTAVA, S. K., ANDERSON, P. B. y ANDERSON, S. A. 1985. ras p21 proteins with high or low GTPase activity can efficiently transform NIH-3T3 cells. Cell 41:599-607.

En las proteínas oncogénicas p21 la actividad de GTPasa está disminuida con relación a las p21 proto-oncogénicas; esta disminución suele ser de aprox. 5 veces. Se estudió la relación entre la actividad de GTPasa, su disminución, y la capacidad transformante con p21 proto-oncogénica; con p21 con mutación del codón 59, que le confiere oncogenicidad; ambas resultaron tener un nivel de actividad de GTPasa similar, mayor que en las 2 proteínas oncogénicas: p21 con mutación del codón 12, y p21 con 2 mutaciones en el codón 12, y en el 59. Se concluye que la región de p21 implicada en la actividad de GTPasa, característica de las proteínas ras, incluye al codón 12 y que la disminución en esta actividad no interfiere con la oncogenicidad de p21, para el parecer no es una condición indispensable para la capacidad transformante de p21.

TRAHEY, M., NILLEY, R. J., COLE, S. E., INMIS, H., PATERSON, H., MARSHALL, C. J., HALL, A. y MCCORNICK, F. 1987. Biochemical and biological properties of the human N-ras p21 protein. Mol Cell Biol 7:541-544.

Las proteínas ras oncogénicas tienen menor actividad de GTPasa comparadas con las proteínas proto-oncogénicas, lo cual se ha estudiado principalmente en p21 de c-Ha-ras, y para determinar si existe una correlación entre ambas actividades bioquímicas en las otras proteínas ras se estudió p21 del proto-oncogene N-ras y del oncogene N-ras con mutación en el codón 12, de la glicina normal a Asp, obtenido de un paciente con leucemia mieloblástica aguda, así como p21 de otro oncogene N-ras con mutación del codón 12, de Gln a Val, obtenido por mutagénesis dirigida. Las 3 proteínas se purificaron en *E. coli*, y se cuantificó su capacidad de hidrolizar el GTP para medir su actividad de GTPasa. La mutante p21-Asp-12 presentó un 43% de la actividad detectada en p21 normal mientras que p21-Val-12 sólo presentó un 12% de la actividad de p21 normal. Se midió la afinidad por GTP y GTP y se registró la misma afinidad en las todas. Se transfectaron los 3 genes en células NIH-3T3 y el proto-oncogene no indujo transformación mientras que las 2 mutantes transformaron las células con la misma eficiencia. Se concluye que en las proteínas ras no existe correlación entre la afinidad por nucleótidos de guanina y la actividad de GTPasa y que tampoco hay correlación entre la actividad de GTPasa y la capacidad transformante, lo que indica que los oncogenes ras activos han de ocasionar otros efectos, tal vez aún desconocidos, mediante los cuales inducen la transformación.

Dea, C. A., FINEL, C. J., GUYER, C. L. (1984). Biological and biochemical properties of mouse ras genes mutated at codon 61. Cell 44:167-176.

Se han reportado mutaciones ras activadas mediante mutaciones en el codón 61, y para caracterizar las consecuencias oncogénicas y bioquímicas de dichas mutaciones, se indujeron mutaciones dirigidas al codón 61 en fragmentos con la secuencia de c-Ha-ras humano. La Glu-61 normal se cambió por 17 diferentes aminoácidos y los 17 fragmentos se insertaron en plásmidos, se transfirieron en células NIH-3T3 y se cuantificó la oncogenicidad según la cantidad de "focos" de células transformadas por ng. de ADN. De los 17 aminoácidos, Val generó la mayor oncogenicidad de p21, con 130 focos X ng. de ADN, seguido de Leu, Lys, Ala, Cys y Arg, en orden decreciente. Los aminoácidos que confirieron una oncogenicidad moderada fueron en orden decreciente, Asn, Ile, Met, Thr, Tyr, Trp y Phe, el menos transformante fue Gly, con 0.4 focos X ng de ADN, y Pro y Gln, no activaron la proteína. En total, las mutantes cubrieron un rango continuo de 1000 unidades de transformación ("focos" X ng. de ADN). Los plásmidos con las mutantes Pro y Gln, el proto-oncogeno indujeron transformaciones con concentraciones altas de ADN. La cantidad de p21 en las células transformadas con diversas mutantes fue 20 veces mayor que en las transformadas con Leu-61 y también hubo 20 veces más p21 en células transformadas con la secuencia normal, con Pro y con Gln, unidas a promotores virales. Todas las mutantes tuvieron igual afinidad por GTP y GMP que la proteína normal, pero la actividad de GTPasa, comparada con la proteína normal, disminuyó de 3 a 10 veces en las 17 mutantes, sin que hubiera correlación cuantitativa entre la reducción de la actividad de GTPasa, y la capacidad transformante. Se concluye que la reducción en la actividad de GTPasa no es suficiente para activar la capacidad oncogénica de p21, y que posiblemente ocurra una alteración a nivel de la conformación de p21, pues al cambiar su estructura debido a una mutación del codón 61 (o 12), puede alterarse la conformación del sitio activo para la actividad de GTPasa.

YEMELUS, C. L., GIBBS, G. W., y SHAMMO, G. N., *BIOLOGY*, 1, 3.
SCOLNICK, E. M., 1988. Total cell assembly and proteins have conserved biochemical properties. *Journal of Cell Biochemistry*.

Las proteínas Ras1 y Ras2 de *S. cerevisiae*, tienen gran homología estructural a partir del aminoácido 3 de la proteína de mamífero, que corresponde al aminoácido 19 de Ras1 y Ras2. Para establecer si existía también homología funcional, se obtuvieron tres fragmentos con los aminoácidos 10-117 del extremo amino terminal de la proteína Ras1, uno de ellos con una mutación en el codón 39, otro en el 41 que activan p21 humano, y otro sin mutación. Los 3 fragmentos presentaron afinidad por GTP/GDP, así como actividad de GTPasa, aunque en los fragmentos anteriores esta actividad resultó estar disminuida con respecto al fragmento sin activación. Estos son también las características bioquímicas de p21 de mamífero, con lo que se estableció la similitud funcional entre las proteínas ras de mamífero y de *S. cerevisiae*.

DER, C. J., PAN, H.-T., COOPER, G. H., 1988. ras1 mutants deficient in GTP binding. *Mol Cell Biol* 8:2291-2294.

Se compararon las secuencias de diversas proteínas con afinidad por nucleótidos de guanina los factores de elongación de bacterias EF-Tu y EF-G, la subunidad alfa de la transducina, los genes ras de *D. melanogaster*, *O. discoideum*, *S. cerevisiae*, y los 3 genes ras humanos. Se observó una secuencia muy conservada en la región de los aminoácidos 116-117 de los genes ras humanos, que en todas las proteínas es Asn-Lys-Asp. Para evaluar la importancia de estos aminoácidos en la unión a GTP, se indujeron mutaciones dirigidas en la proteína del oncogene c-Ha-ras humano, activada por medio de una mutación en el codón 61, de Glu a Leu, y se obtuvieron tres mutantes: 116-His con mutación de la Asn normal por His, 117-Glu, sin la Lys normal, y 119-His, sin su Asn normal. La afinidad por GTP de las 3 mutantes fue 10-2000 veces menor que en la p21 normal in vitro. Las mutantes presentaron la misma capacidad transformante que p21 oncogénica control, indicando que los aminoácidos 116-117 y 117 están en una región directamente involucrada en la unión a GTP/GDP, y las mutaciones en estos sitios reducen o gta afinidad in vitro, lo que no significa que in vivo ocurra esto mismo, pues la concentración celular normal de GTP suele ser mayor que la afinidad de p21 por GTP, y aún si disminuye la afinidad, GTP puede adquirirse uniendo a p21 por saturación, y otra posibilidad es que la unión a GTP no sea indispensable para la transformación.

STUDY OF THE PROPERTIES OF THE AFFINITY OF THE PROTEIN FOR GDP. THE AFFINITY OF THE PROTEIN FOR GDP WAS STUDIED WITH PROTEIN-GDP AFFINITY FOR GDP. THE AFFINITY OF THE PROTEIN FOR GDP.

En análisis de difícil afectar los niveles experimentales que en el análisis de diagnóstico de punto R21 para estudiar los cambios secuenciales, pero en los estudios iniciales inactivada al nivel de la proteína, las propiedades de p21 se relacionan con la afinidad por GDP/GDP, pero para sus estudios como GTPasa y anticóncilares se muestra el fosfato de GTP por lo que se busca una p21 con mayor afinidad por GDP, entonces se generó el caso, para un lineal - anticóncilares de la célula, la secuencia obtenida mostró una mutación en el codón 17 de la secuencia normal a Gpp, p21 con esta mutación, registró un nivel de eficiencia por GDP 20-40 veces mayor que por GTP. La secuencia con esta mutación se insertó en un plásmido que se transfirió en células NIH-3T3, no se observó transformación de ninguna célula y sólo muy pocas células de células NIH-3T3 se compararon al plásmido, estas células reactivas con retroviral los títulos y expresaron muy poca o nada de p21, indicando que la mutación inhibió la proliferación celular, en estas células se transfirió un plásmido con retroviral oncogénico con mutación en el codón 61, p21-Leu-61 y las células se transformaron y empezaron a proliferar con gran velocidad. Se transfirió también el protón cognos-tras que en grandes cantidades estimuló el crecimiento de las células con la mutación Asp-17 pero no tanto como p21-Leu-61. Se analizó el efecto de otras oncogenes. El oncogene v-src no tuvo efecto alguno, ni transformante ni proliferativo, con virus de estimuló la proliferación pero no hubo transformación y con virus no se estimuló la proliferación pero sí la transformación. Se cotransfectó la secuencia ASN-17 mutante con otras secuencias, y se observó que esta mutación inhibió la capacidad transformante de v-src, no inhibió a v-raf ni a v-moc, pero en grandes cantidades la proteína Asp-17 mutante inhibió la oncogenicidad de p21-Leu-61, lo que indica que para la transformación, en las células posiblemente sea más determinante la cantidad de la proteína oncogénica actual, más que sus mutaciones. Se indujo otra mutación en la proteína p21-ASN-17 en el codón 166, eliminando la Cys normal y se observó que además de que la proteína no se unió a la membrana, no inhibió la proliferación de las células transfectadas, ni tampoco inhibió a v-src, ni a p21-Leu-61. Cabe señalar que el codón 17 está muy conservado en diversas proteínas ras; los cambios fenotípicos registrados, son consecuencia de la afinidad preferencial de p21 por GDP y de las alteraciones funcionales resultantes, y puesto que la proteína alterada impide el adecuado funcionamiento de las proteínas ras intrínsecas de las células, se concluye que la participación de p21 es muy importante para la proliferación celular.

FE16. L. A. PAN. 8-1; 1988; T. 11. COLON. N. 1. 1988.
Isolation of Ras GTP-binding proteins using an in vitro GTPase
binding assay. Proc Natl Acad Sci USA. 85:1807-1811.

Las proteínas Ras normal y oncogénica, presentan diferencias en su actividad de GTPasa, que es menor en las proteínas con mutación del codón 12 o 61; sin embargo la afinidad por GTP/GDP no se altera, por ello se estudió dicha afinidad mediante mutaciones al azar en v-ha-ras expresado en bacterias, y se obtuvieron 3 mutantes con deficiencias en su afinidad por GTP/GDP con mutaciones puntuales en los codones 117, 146 y 83, en las que el factor de disociación aumentó entre 25-100, comparadas con la proteína control. lo que significa que su afinidad por GTP/GDP disminuyó en igual medida. Los aminoácidos 83 y 119 están en regiones muy conservadas en las diferentes proteínas Ras. Al transformar células NIH-3T3 con estas mutantes, la eficiencia de transformación fue igual a la de p21 control. Estos resultados en principio harían suponer que la afinidad por GTP no es determinante para la acción oncogénica de p21; sin embargo en las células transformadas las proteínas mutantes se fosforilaron al mismo nivel que la proteína control. El hecho de que aun la proteína con mutación en el codón 117, cuya reducción en la afinidad por GTP/GDP fue de 100 veces, se fosforilara in vivo, puede deberse a que en la célula, la concentración de GTP es aprox. 5 veces mayor que la afinidad de p21 control por GTP, por lo que aun saturándose la proteína puede unirse a GTP. Esto indica que aún no se ha determinado in vivo, la importancia de la afinidad por GTP/GDP en los mecanismos transformantes de p21, pues in vitro no se observan los mismos resultados detectados in vivo.

WILLUMSEN, B. H., PAPAGEORGE, N. G., MORA, H. F., BERESI, T., ROBBINS, T., JOHNSEN, H., VASS, W. O., LOWY, B. R. 1986. Mutational analysis of a ras catalytic domain. Mol Cell Biol 6:2248-54

La proteína ras puede dividirse en tres dominios funcionales: El extremo carboxilo terminal, requerido para la unión lipídica y subsecuente localización membranar de p21; la región intermedia, la más variable entre las diferentes p21, que en p21 de mamíferos no es esencial para la oncogenicidad ni para las propiedades bioquímicas de p21; y los 100 aminoácidos del extremo amino, los más conservados, que se consideran el dominio catalítico. Se estudió este último con diversas mutaciones en el extremo amino de p21 de v-Ha-ras, suponiendo que casi cualquier variación en dicho dominio alteraría la función de p21 dada su conservación, y sin embargo se encontraron 3 regiones en los aminoácidos 69-72, 72-100 y 123-139 que no son esenciales para la oncogenicidad, esto es, que p21 puede carecer de alguna de estas 3 regiones, y aun con tan grandes delecciones, mantiene su oncogenicidad y sus propiedades bioquímicas. Se identificaron 3 regiones indispensables para la oncogenicidad, 3 de ellas también se requieren para la afinidad por GTP/BDP pues al perderse esta capacidad, p21 al parecer se vuelve inestable. La capacidad de unirse a GTP/BDP parece ser necesaria, pero no indispensable para la transformación. Es notable que cambios tan considerables en la secuencia de p21, y seguramente en su conformación, no alteren su funcionalidad, y que sin embargo se haya conservado tanto durante la evolución la secuencia de su extremo amino. Se concluye que, para que p21 pueda ejercer su acción oncogénica, requiere de su afinidad por nucleótidos de guanina, su localización membranar y alguna otra actividad bioquímica, aun no determinada.

WIGLER, M., FASANO, O., TRIMMER, S., PURVIS, C., KATAGIRI, T.,
BIRNBAUM, D., SHIMIZU, K., GOLDFARB, R. 1984. Structure and
activation of ras genes. *Cancer Cells* 10:417-426.

Se compararon las diferentes proteínas ras y se encontró que las tres p21 humanas son idénticas en los primeros 86 aminoácidos. En los aminoácidos 87-170 la homología es mayor a 90%, y en los siguientes 15 aminoácidos existe la mayor divergencia. Las 3 proteínas terminan con la secuencia consenso DyaAAx, donde A es un aminoácido alifático, y x cualquier aminoácido. La región terminal puede considerarse como la que confiere la especificidad fisiológica de cada p21. Las proteínas RAS1 y RAS2 de *S. cerevisiae*, constan de una corta secuencia inicial, seguida de 80 aminoácidos cuya homología es de casi 70%, con los primeros 80 aminoácidos de p21 de c-Ha-ras, y en los siguientes 80 aminoácidos la homología entre ambas es de 50%. Las proteínas RAS de levadura son mayores que las de mamífero, pero también terminan con la secuencia DyaAAx. Se registraron los efectos de mutaciones en p21 distintas de las reportadas en los codones 12 y 61, induciendo mutaciones al azar en el proto-oncogene c-Ha-ras humano, y se observó que las mutaciones en los codones 13, 59 y 63 también activan p21. Ninguna de estas mutaciones se ha reportado en muestras de tumores, pero probablemente se encuentran, pues también son sitios críticos de p21.

STONE, J. C., VASS, W. C., WILLUMSEN, B. M. y LOWY, D. R. 1988. p21-ras effector domain mutants constructed by "cassette" mutagenesis. *Mol Cell Biol* 8:3565-3569.

En las proteínas ras existe una región que abarca los aminoácidos 32-40 de c-Ha-ras, considerada como efectora, pues las mutaciones en esta región generan una p21 asociada a la membrana, con afinidad por GTP/GDP y poca actividad de GTPasa, pero no transformante y en *S. cerevisiae* estas mutaciones afectan la vía del AMPc es una región muy conservada en las proteínas ras, y puede ser el sitio activo donde p21 interactúa con la molécula efectora. Se indujeron varias mutaciones en esta región con la técnica de mutagenesis de cassette, mediante la inserción del oligonucleótido con la secuencia mutante en el ADN, para reconstruir todo el v-Ha-ras. Se indujeron así diversas mutaciones en los codones 36 y 40 y una mutación en cada uno de los codones 32, 35 y 39. Se cambió el codón Tyr-32 normal por Phe-32, y Thr-35 normal por Ser-32, que son mutaciones conservativas y ninguna fue transformante; por otro lado, Ser-39 normal se cambió por Cys-39 y la mutante mostró una capacidad transformante similar a p21 viral. Las 3 mutaciones conservativas inducidas en el codón 36 de Ile-36 normal a Leu, Val y Met-36 generaron mutantes con una oncogenicidad reducida en comparación con p21 viral; la transformación ocurrió lentamente y en pocas células, que se dividieron muy despacio. La mutante Ala-36 no fue nada transformante. Se cambió la Tyr-40 normal por Phe-40 que también transformó con escasa eficiencia, pero Ile-40, Val-40 Gly-40, Ser-40 y Arg-40 no transformaron. Así se definieron tres clases funcionales de aminoácidos en esta región: Los aminoácidos 32 y 35 que aun con la mutación más conservativa suprimen la oncogenicidad; los aminoácidos 36, y 40, que solo permiten mutaciones muy conservativas sin perder del todo la capacidad transformante; y el aminoácido 39, que confiere oncogenicidad aun con mutaciones no muy conservativas.

KUNO, H.-F., SMITH, M. R., REUBEN, S., DUNN, V. y ARNOLD, H. W. 1986. Generalization of the conditions for synthesis of monoclonal antibodies against human c-Ha-ras proteins. *Exp Cell Res* 164:602-611.

Se estudió la función de las proteínas ras mediante ensayos inmunológicos con los anticuerpos monoclonales anti-p21: YAG-172, Y13-238 y Y13-259, generados contra proteínas virales de Ha-MuSV, Ra-MuSV y BALB-MuSV. Se hicieron ensayos de ELISA y Y13-259 recogió p21 del gene c-Ha-ras humano, mas intensamente que YAG-172. La proteína p21 producida en bacterias, se mezcló con cada uno de los anticuerpos, y se microinyectó en células NIH-3T3. Las células inyectadas con YAG-172 y Y13-238 se transformaron pero las células inyectadas con Y13-259 no mostraron ninguna alteración, indicando que hubo un bloqueo en la oncogenicidad de p21. Y13-259 se inyectó en células transformadas con c-Ha-ras humano, y se observó la reversión fenotípica de las células hasta recuperarse el fenotipo normal. La proteína p21 unida a Y13-259 conservó su afinidad por GTP/GDP. Se ignora la naturaleza de la interacción entre p21 oncogénica y Y13-259 pero debe ocurrir en un sitio muy importante para la capacidad transformante de los oncogenes ras.

SIGAL, I. G., SIBBS, G. F., D'ARLUNZO, J. G., SOCLINICK, E. H. 1988
Identification of effector residues and a neutralizing epitope of
Ha-ras-encoded p21. Proc Natl Acad Sci USA 85:4735-4739.

Las proteínas ras tienen propiedades similares a las proteínas-G, que son transductoras de señales a través de la membrana. Para saber si p21 tiene una función similar, se identificaron los aminoácidos que puedan intervenir en la interacción de p21 con la o las posibles moléculas efectoras. Se hicieron diversas mutaciones en la proteína del gene *h-Ha-ras*, en particular en las regiones más conservadas, que son los aminoácidos 32-42 y 61-80, y que también se encuentran en otras proteínas-G. Se determinó que las mutaciones en los aminoácidos 33, 36, 38, 40, y un poco menos, en los aminoácidos 39 y 78, alteran la oncogenicidad de p21. Se hicieron ensayos de proteínas ras de mamíferos en levaduras y viceversa. En levaduras con interrupción del gene *RAS2*, y deficiencias en la adenil ciclasa, las proteínas ras de mamífero, modificadas, subsanaron las deficiencias, pero con el anticuerpo Y13-259 de nuevo presentaron deficiencias en la adenil-ciclasa. Las mutaciones en los aminoácidos mencionados no afectan la afinidad por GTP/GDP ni la actividad de GTPasa. Se determinó que el sitio de unión al anticuerpo Y13-259 comprende los aminoácidos Glu-63 Ser-65 Ala-66 Met-67, Gln-70 y Arg-73. Al parecer, el bloqueo de proteínas ras causado por Y13-259 no se debe a que Y13-259 se una al sitio activo de p21, sino que al unirse el anticuerpo ocurre una alteración estructural que afecta indirectamente al sitio activo.

HATTORI, S., CLANTON, D. J., SATOH, T., NAKAMURA, S., KAZIRO, Y., KAWAKITA, M., SMITH, T. Y. 1987. Neutralizing monoclonal antibody against ras oncogene product p21 which impairs guanine nucleotide exchange. Mol Cell Biol 7:1999-2002.

El anticuerpo Y13-259 es muy importante para estudiar la función de los genes ras, su epitopo está en los aminoácidos 63, 65, 66, 67, 70 y 73; sin embargo esta región no se considera indispensable para la función de ras, y aun falta definir la interacción entre Y13-259 y p21. Se estudió si la alteración que Y13-259 induce, se debe al intercambio nucleotídico con p21, o si altera la afinidad en sí. Las proteínas ras se unen a GTP/GDP pero el tiempo que se mantiene la unión también puede ser importante, como sucede con otras proteínas-G, que unidas a GTP, se encuentran en el estado activo de su función transdutora, y cuando hidrolizan al GTP y se unen a GDP, se inactivan. Se midió la tasa de disociación de p21 a GTP y GDP unida a Y13-259 y se confirmó que el anticuerpo interfiere con la reacción de intercambio entre el nucleótido unido a p21 y el exógeno no tanto con la afinidad en sí. La alteración que causa el anticuerpo Y13-259 no se definió con precisión, pero tal vez sea de tipo alostérico, mediante un cambio de conformación que afecte al sitio activo, o posiblemente el tamaño de Y13-259 mayor que el de p21, sea lo que dificulta su actividad.

JURNAK, F. 1985. - Structure of the GDP domain of EF-Tu and location of the aminoacido homologous to ras oncogene proteins. Science 230:32-34.

En *E. coli* durante la síntesis de proteínas, el factor de elongación (EF-Tu) reconoce, transporta y sitúa el ARN de transferencia específico para codones aminoacil en el sitio A del ribosoma. EF-Tu interactúa con GDP y GTP, que funcionan como efectores alérgicos que alteran su conformación. A diferencia de las proteínas que unen nucleótidos de adenosina, se conocen pocas proteínas que unan nucleótidos de guanina, y por esto es interesante que las proteínas ras se unan a GTP/GDP. Se estableció la estructura tridimensional de EF-Tu unida a GDP y las regiones homólogas con p21 de c-Ha-ras. El factor EF-Tu se purificó, se cristalizó y por difracción de rayos X, a 2.7 angstroms de resolución se definió que EF-Tu-GDP tiene 3 dominios: El más prominente tiene 3 beta-plegadas, rodeadas por 6 alfa-hélices, y se identificó como el extremo amino; el segundo dominio es una estructura beta-plegada con 6 filamentos antiparalelos, y otro alrededor, formando una especie de "bolsa" hidrofóbica y es el extremo carboxilo, y el tercer dominio es una beta-plegada en forma de pequeño "barril" con un centro hidrofóbico y es el polipeptido intermedio. El GDP se une mediante un ion Mg a la Asp-80, y se sitúa en la punta de los filamentos 1, 3, 4, y 5 de la beta-plegada del extremo carboxilo; el anillo de guanina, lo rodean aminoácidos hidrofóbicos, como Ala-107, Phe-133 y Leu-134. Se definieron cuatro regiones de homología con otras proteínas que se unen a GDP, como p21-ras: Región 1 - aminoácidos 15-29; Región 2 - aminoácidos 79-87; Región 3 - aminoácidos 99-108, y Región 4 - aminoácidos 128-140. La región 1 es la más homóloga, e incluye al sitio que rodea los 2 fosfatos del GDP, la región 2 es donde se une el ion Mg, y las regiones 3 y 4, rodean al GDP, es decir, que las cuatro regiones homólogas participan en la unión a GDP. El aminoácido Val-20 de EF-Tu que corresponde al Gly-12 de p21, está en la región donde se sitúan los fosfatos de GDP, y al alterarse, afecta la conformación del sitio de unión de GDP. Esta estructura tridimensional permitirá explicar la estructura y función de proteínas similares, como p21-ras.

LOCKHART, M. D., 1980; ST. B., 1981; H. L., 1983. Expone el
proceso subunit of photoreceptor transduction. Incluye la trans-
ducción, ras and elongation factors. Science 219:94-97.

La transducina es una proteína G, que se localiza en la mem-
brana de los bastones de los fotorreceptores, su función es inter-
actuar con la rodopsina al ser iluminados los fotorreceptores, y
como resultado de la interacción el GTP, unido a la subunidad al-
fa de la transducina, cambia a GDP, de este, que la transducina
tiene capacidad para activar una GTPe-fosfodiesterasa. El ciclo
se completa cuando la transducina hidroliza el GTP, restaurándose
el complejo transducina-GDP. Se estudia la naturaleza de la trans-
ducina, y se observaron notables similitudes con p21 ras; las dos
presentan afinidad por nucleótidos de guanina y actividad de GTPe-
asa y particularmente en 2 regiones entre las q en homología; la
primera comprende los aminoácidos lys-29 a lys-70, hacia el extremo
de amino, que es la región involucrada en la hidrólisis de GTP en
p21, y la segunda región se encuentra hacia el extremo carboxilo,
del Ala-260 a Lys-274, que en la transducina es la región que par-
ticipa en la unión a GTP. El cuarto aminoácido del extremo carboxi-
lico es cisteína en la transducina y en GTPe proteínas ras estudi-
das, lo que significa que es un aminoácido muy importante para la
función de las proteínas ras.

DE VOS, A. M., TONG, L., HILDEBRAND, N. V., MATIAS, F. M., JONCARIK, J., NOGUCHI, S., NISHIMURA, S., NIURA, K., OHTSUKA, E., KIM, S.-H 1988. Three dimensional structure of an oncogene protein: Catalytic domain of human c-Ha-ras p21. Science 259:868-873.

Todas las proteínas ras presentan homologías en los aminoácidos 1-171; los demás aminoácidos son muy variables, excepto los 4 últimos, necesarios para la unión membranal. Los 18 últimos aminoácidos, al parecer forman una estructura muy flexible, y para que no interfirieran al estudiar la estructura de p21, sólo se estudió el dominio catalítico, del aminoácido 1-171. El péptido se produjo en bacterias y mediante difracción de rayos X, se definió su estructura. Su forma es compacta, un poco redondeada y mide 35 X 40 X 49 angstroms, consta de 6 filamentos de beta-plegada, 4 alfa hélicos, y 9 segmentos ("loops") de conexión. Los filamentos de la beta-plegada numerados del extremo amino al carboxilo están en el orden β -2, β -1, β -3, β -4, β -5 y β -6 con la β -2 antiparalela a las demás. Los filamentos β -2, β -1 y β -3 forman un grupo, y los β -4, β -5 y β -6 forman otro. Los alfa-hélicos α -2 y α -3 están en la cara convexa de la beta-plegada y α -1, y α -4 en la cara concava, α -4 del extremo carboxilo es la alfa-hélice más larga. Los loops 1, 2, 7 y 9 están en el sitio de unión a GDP; el loop 1, con los aminoácidos 10-16, está cerca de los fosfatos, y el loop 2, cerca de la ribosa. Los aminoácidos 116, 117, 119 y 120 del loop 7, y 145-147 del loop 9 rodean la guanina. Estos sitios son clave para la función de p21. Los aminoácidos 57, 61 y 63 están en el loop 4, que está en contacto con el loop 1 y que al cambiar, altera la conformación. La posición 59 está en el filamento 3 cerca del sitio donde se unen los fosfatos, y si el aminoácido en esta posición es la treonina como en p21 viral, dicha treonina puede aceptar al fosfato sin cambio conformacional. En el loop 1 está el sitio responsable de la hidrólisis de GTP. El sitio donde se une el anticuerpo Y13-259 en los aminoácidos 63-73 está en el loop 4, casi opuesto al sitio de unión a GDP; su efecto sobre p21 posiblemente sea ocasionado por un cambio conformacional. Es probable que al menos uno de los sitios de p21 que están expuestos, sea el sitio de unión de alguna molécula efectora o mensajera, como en el caso de las proteínas-G similares a p21. La estructura descrita no tiene los últimos 18 aminoácidos del extremo carboxilo, que es el extremo unido a la membrana, por lo que es probable que en la célula el dominio catalítico se encuentre un tanto separado de la membrana, y p21 no esté totalmente inmersa. Esta es la primera estructura tridimensional descrita de las proteínas oncogénicas conocidas.

Las proteínas codificadas por los genes *ras* y *src* en el *pcr* y *src*, se encuentran en todas las células normales, en todas las etapas de la vida, y en todas las clases de tejidos, en mamíferos (Liron y cols., 1987), y en humanos (Parks, cols., 1977).

PROTEÍNAS-G

Las proteínas p21ras poseen las mismas características de las proteínas-G localizadas en la membrana citoplásmica, con afinidad por nucleótidos de guanina y actividad de GTPasa. Las proteínas-G conocidas tienen todas en sí mismas diseño estructural: existen como oligómeros formados por 3 subunidades: alfa beta y gamma. En la forma inactiva de la proteína-G, la subunidad alfa está unida a GDP, y también a las subunidades beta y gamma. Al excitarse un determinado receptor de membrana, se activa la proteína-G, que induce el aumento en la tasa de intercambio del GDP unido a la subunidad alfa, por GTP; posteriormente, la subunidad gamma se disocia de las subunidades beta y gamma y altera la actividad de su proteína blanco, o canal de iones, y finalmente la subunidad alfa hidroliza su GTP unido, el cual se convierte en GDP, y termina la activación; esto es, la activación de las proteínas-G conocidas depende estrictamente del intercambio entre GDP/GTP para su activación para su forma inactiva, forman complejos de proteínas-GDP, y se convierten a la forma activa, unida a GTP, en respuesta a una determinada señal. p21-ras presenta mayor similitud con la subunidad alfa por su afinidad por nucleótidos de guanina y por su actividad de GTPasa, aunque no se han reportado estructuras que actúen como subunidades beta o gamma asociadas a p21. Entre las proteínas-G se conocen: La subunidad reguladora de la adenil ciclasa (Gs) y la subunidad inhibitoria (Gi) que regulan la transmisión de señales al interior de la célula; dichas señales se manifiestan por medio de cambios en la concentración de AMPc (Gilman, 1980).

PARTICIPACIÓN DE p21 EN LA VÍA DE LA ADENIL-CICLASA

En *S. cerevisiae* el AMPc actúa como un regulador esencial para la división celular por medio de la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc. En *S. cerevisiae*, el AMPc participa en el ciclo celular durante el paso de la fase G₂ a la fase G₁, y en la esporulación. Las proteínas Ras intervienen en la adenil ciclasa de levaduras, pues la disrupción de RAS1 y RAS2 resulta letal, a menos que en la célula ocurra otra alteración que incremente el nivel intracelular de AMPc o evite el requerimiento de AMPc para estimular el crecimiento celular. En *S. cerevisiae*, el gene CDC25 afecta los niveles de AMPc celulares, y se requiere para el paso a la fase G₁. Si la disrupción ocurre solo en RAS2 las mutantes muestran el mismo fenotipo que las levaduras con alteraciones en el metabolismo de AMPc: el nivel de AMPc es menor al de las células normales, las mutantes son viables, pero no se dividen bien en medios de cultivo con carbon no fermentable, como etanol o glicérol, acumulan carbohidratos, y esporulan prematuramente. Estas son las mismas reacciones de respuesta de *S. cerevisiae* en situaciones de escasez de nutrientes (Mitchell y cols., 1985).

Las proteínas RAS son una subclase de proteínas G, las que actúan como un interruptor molecular en las células, dando lugar un incremento en la actividad de varias enzimas (Gada y cols., 1985), por lo tanto aumentan las niveles de ATP en el citoplasma. El sustrato muestra niveles bajos de carbohidratos de almacenamiento mayor esporulación, y baja viabilidad. Dichos fenómenos se parecen al de las levaduras con deleción del gen *CCC28*. Las proteínas RAS con deleción del dominio efectorio, también ocasionan un fenotipo similar (Marshall y cols., 1987). Por lo tanto, la proteína del gen *CCC28* parece jugar la función de la proteína RAS, mediante el incremento de los niveles de la forma RAS-GTP, ante el la razón por la cual con la mutación *RAS1-Hal-11* no se requiere la proteína *CCC28*, pues la proteína *RAS1-Hal-11* permanece unida a GTP en forma constitutiva. Vale la pena que la proteína *CCC28* actúa tanto a la proteína de *RAS1* como a la de *RAS2*, pues se sabe activara una de ellas la transcripción del gen *CCC28* en forma *trk1*.

En las levaduras normales la adenil ciclasa funciona con GTP preferentemente (Fild y cols., 1987) pero en las proteínas mutadas *RAS2-val-19*, la actividad se hace independiente de GTP (Uno y cols., 1985). En un principio se propuso que la proteína *RAS2* podría ser la subunidad reguladora de la adenil ciclasa de levaduras pero no se han obtenido pruebas concluyentes de que cumpla dicha función, pues aunque es evidente que las proteínas RAS participan en dicha actividad, aun se desconoce su papel específico.

La adenil ciclasa es un complejo, al parecer formado por una proteína de 200 Kd codificada por el gen *CYS* y otra proteína aun no caracterizada de 70 Kd, activada por las proteínas *RAS2* (Fild y cols., 1985). Es posible que, mas que un elemento constitutivo, las proteínas RAS actúan en un cierto proceso metabólico previo a la adenil ciclasa, en un nivel donde probablemente también existen alteraciones aun desconocidas en otras vías metabólicas y situación entre la llegada de la señal extracelular, y las reacciones intracelulares consecuentes. Esto se ha investigado en levaduras en fase estacionaria, en asporas y en levaduras cultivadas en medios de carbon no fermentable, en las cuales al añadir glucosa al medio se induce una señal de AMPc que desencadena una cascada de fosforilación de proteínas; esta cascada es responsable del rápido consumo de la trehalosa, que es un carbohidrato de reserva, de la inhibición de la gluconeogénesis y de la estimulación de la glucólisis. Se desconoce el mecanismo por el cual la glucosa genera la respuesta en el AMPc pero en este mecanismo las proteínas RAS juegan un importante papel, lo que sugiere que la interacción entre proteínas RAS y la adenil ciclasa es indirecto tal vez en un paso intermedio entre la llegada de la señal y la activación de la adenil ciclasa (Nbenyi y cols., 1985).

La función de las proteínas RAS en *S. pombe* y la similitud entre p21 y las proteínas G5 y G1 de la adenil ciclasa de mamíferos hicieron surgir la posibilidad de que en mamíferos la función de las proteínas ras fuera similar, pero al investigarlo, se descarto esta hipótesis pues se demostró que las proteínas p21 de ras de humanos no participan en la adenil ciclasa (Beckner y cols.

Se hizo una reevaluación de los parámetros idénticos con ras proteínas RAS de *S. cerevisiae*, los cuales no necesariamente incluyen una función igual en mamíferos pues no necesariamente tienen presentes las diferencias entre las levaduras, organismos unicelulares, y los mamíferos, pluricelulares y mucho más complejos; tal vez la clave sea que la función no es idéntica sino equivalente, pues en *S. cerevisiae* los nutrientes actúan en forma análoga a los aparatos extracelulares que llevan señales a las células de mamíferos como hormonas y factores de crecimiento, y en los levaduras, las proteínas RAS actúan al nivel donde se genera la señal al interior celular; tal vez en células de mamíferos funcionan en forma equivalente. Además consideramos las similitudes con las proteínas-G y la localización membranal de las proteínas RAS es posible que tengan una función de tipo transdutora, y participan en la transmisión de señales al interior de la célula.

METABOLISMO DE LOS INOSITOL FOSFOLÍPIDOS

Otra vía metabólica para la transmisión de señales en la célula, donde se ha registrado una posible participación de las proteínas ras es el metabolismo de los fosfolípidos, particularmente en la vía de la Proteína-Cinasa-C (Bell, 1984). Esta vía indica al llegar una cierta señal a la célula que mediante alguna proteína transdutora en la membrana, la cual no se ha identificado, activa una enzima la fosfolipasa-C que estando activa hidroliza los inositolfosfolípidos de la membrana; la hidrólisis produce diacilglicerol e inositol trisfosfato (InsP₃). El diacilglicerol permanece en la membrana donde funciona como segundo mensajero y activa la Proteína-Cinasa-C, una enzima localizada en la membrana celular que participa en numerosas funciones como la activación del canal de Na⁺/H⁺ en la membrana, generando un aumento del pH citoplasmático y en los iones de sodio libres; uno de los sustratos fosforilados por la Proteína-Cinasa-C, es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF), con cuya fosforilación se regula su afinidad por el EGF. La Proteína-Cinasa-C en general cumple un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular. Por su lado el InsP₃ también actúa como segundo mensajero activando la movilización de iones Ca²⁺ en la célula.

Las proteínas RAS de *S. cerevisiae* al parecer intervienen en la regulación de la vía metabólica de los inositol-fosfolípidos (Kobuchi y cols., 1980), sin embargo en células de mamífero, los resultados que hasta el momento se han reportado sugieren que p21 participa de alguna manera en esta vía metabólica, pero los intentos por definir esta participación han generado resultados un tanto confusos pues así como se ha propuesto que p21 participa en la activación de ambas vías, la vía del AMPc y la del fosfatidilinositol (Sugimoto y cols., 1983) también se ha reportado que p21 estimula la fosfolipasa-C (Wolman y Macera, 1987); en otros reportes se ha encontrado que p21 estimula la fosfolipasa-C2 (Bar-Sagi y Feramisco, 1986), o bien que activa la Proteína-cinasa-C (Eller y cols., 1987); incluso se ha detectado que la Proteína-cinasa-C fosforila p21 codificada por el gene *c-Ha-ras* (Ballinger y cols., 1987). En las células transformadas por oncogenes ras existen alteraciones en toda la vía de la Proteína-Cinasa-C (Kamata y cols.,

1987) y se ha propuesto que la proteína efectora de p21 en esta vía metabólica, tiene un parecido al p21 de los proto-oncos, que actúan en la transducción de señales. Al interior celular es que p21 pueda ser la proteína desconocida que transmite la señal para dar inicio a esta vía (Watanabe y cols., 1988). Sin embargo, p21 también podría participar en otras señales, pues en las células, p21 induce un rápido incremento de Ca^{2+} intracelular, aunque sin un mecanismo de regulación del calcio (Hagag y cols., 1987).

El metabolismo de los fosfolípidos también puede estimularse con otros oncogenes, que han generado la misma respuesta que p21, indicando que tal vez existen vías bioquímicas comunes en el proceso transformante inducido por los oncogenes, y en ese caso, p21 no tendría una intervención directa, cumpliendo alguna función específica, en regulación alguno elemento de esta vía (Santoro y cols., 1988).

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) regula el metabolismo de los fosfolípidos, pero la presencia de p21 paree de alterar su capacidad reguladora, tal vez debido a que los dos participan en dicho metabolismo de manera distinta (Kamata y Kung, 1988).

Se ha descrito una proteína llamada GAF ("GTPase activating protein"), que estimula la actividad de GTPasa de p21 proto-oncogénica, pero no de p21 oncogénica; existen regiones de p21 que interactúan directamente con GAF y otras que pueden coexistir sin que se afecte dicha interacción; estas regiones dispensables coinciden con las regiones dispensables para la transformación. La delección de las regiones variables que distinguen las diferentes proteínas p21 (de los genes H-ras, K-ras, y las 2 p21 de K-ras humanos) no afectan la interacción con GAF (Adami y cols., 1988). Estos datos señalan a la proteína GAF como candidata a ser la proteína efectora de p21 cuya acción sería de tipo regulatorio de la función de p21, es decir que la acción de GAF estaría en un nivel intermedio entre la señal que induce una respuesta en la proteína p21-ras y las respuestas de p21, normales o transformantes.

LEON, J., GUERRERO, I., PELLICER, A. 1987. Developmental expression of the ras gene family in mice. Mol Cell Biol 7:1533-1540.

En el genoma de ratón, los genes c-Ha-ras, c-Ki-ras y N-ras, codifican proteínas muy similares en propiedades bioquímicas y en estructura, pero que han de tener diferencias importantes que, si no son estructurales ni bioquímicas, podrían encontrarse al nivel de expresión. Para detectar estas posibles diferencias, se cuantificaron los niveles de ARNm de los 3 genes en distintos órganos y en diferentes etapas de la vida, desde embriones hasta adultos. El mayor nivel de expresión fue del gen N-ras en testículo, y un poco menos en timo, y los menores fueron en riñón e hígado. El gen c-Ha-ras se expresa más en cerebro, músculo y epitelio, y menos en hígado y ovario. c-Ki-ras se expresa en promedio menos que el resto; sus mayores niveles fueron en intestino y timo, y muy débilmente en hígado, músculo, ovario y epitelio. En embriones se analizó el ARNm total de los 3 genes, cuyo nivel va decreciendo durante el desarrollo embrionario. Los niveles de c-Ki-ras y N-ras fueron mayores hacia el día 10 de desarrollo embrionario, y disminuyeron al final del embarazo, a diferencia de c-Ha-ras que se expresa más en intestino, riñón y testículo, manteniendo un nivel alto de expresión en cerebro, desde el nacimiento hasta la etapa adulta. c-Ki-ras se expresa más en testículo a partir del día 15 hasta el día 25, disminuyendo después, y en intestino, donde se expresa más hacia el día 20, después del día 20 su expresión disminuye. N-ras se expresa en cerebro y riñón en embriones, decrece después del nacimiento, y sus niveles aumentan en testículo justo después del nacimiento. Los 3 genes se detectaron en todas las muestras analizadas, confirmando que los 3 existen en todas las células, pero se regulan en forma diferencial; el que su regulación sea compleja y el que se expresen en forma independiente y distinta en la célula y durante el desarrollo, indica que tienen distintas funciones, o no se explicaría que todas las células expresen 3 genes separados, que se regulen aparte, para cumplir una misma función. Cabe resaltar la expresión de ras en cerebro, pues ras se considera implicado en la proliferación celular; sin embargo difícilmente puede tener una función proliferativa en el cerebro. Se concluye que es posible que existan implicaciones de ras aún desconocidas.

Para averiguar hasta qué punto existen los genes ras en células normales humanas se estudió la presencia de p21 en distintos tipos de tejidos, tanto embrionarios como de adulto. Se usaron anticuerpos monoclonales y se hicieron técnicas inmunohistoquímicas para cuantificar p21, que se detectó en casi todos los tejidos estudiados, aunque con grandes variaciones en la intensidad de la detección entre tejidos, y entre tipos celulares del mismo tejido. Las muestras embrionales y de adulto fueron similares. No se encontró p21 en melanocitos ni glomérulos y sí en la membrana basal e intermedia, y glándulas de epidermis, nódulos linfáticos, bazo, músculo liso y cardíaco, fibroblastos, condroblastos, endotelio, neumocitos (muy débilmente), epitelio de bronquios, esófago y úterus, en estómago, colon, riñón (excepto glomérulos), testículo, ovario, páncreas, suprarrenales, neuronas, cerebelo, médula y ganglios. En embriones no se detectó en tejidos como timo, músculo esquelético, condroblastos, y tejidos de útero, placenta, cervix, y mama. En general, p21 se encuentra tanto en células proliferativas como en tejidos altamente especializados. La mayor cantidad de p21 se detectó en cerebro indicando que ras debe participar en otras funciones aparte de las proliferativas.

BILMAN, R. B. 1986. G-proteins and dual control of adenylyl cyclase. Cell 46:377.

El sistema de la adenil-ciclase consiste en al menos 3 tipos de proteínas integradas a la membrana citoplasmática, y se caracteriza por su capacidad de recibir información de diversas fuentes, y generar una sola respuesta integral. El proceso se inicia cuando diversas moléculas reguladoras como neurotransmisores, hormonas etc. se acoplan a los receptores membranales, los cuales interactúan con los ligandos endógenos apropiados en la membrana celular, estas interacciones inducen la estimulación o inhibición en la actividad de la adenil ciclase dependiendo de la señal. Cuando la señal es de estímulo la adenil ciclase genera un incremento en el nivel de AMPc celular, que actúa como segundo mensajero en la célula e interviene en diversos procesos, como la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc y fosfatases regulatorias, que actúan sobre una serie de funciones de fosforilación. Las moléculas regulatorias incluyen homólogos beta adrenérgicos, β DNH, gong dotropinas y muchas otras, y las inhibitorias pueden ser opioides y homólogos alfa-2-adrenérgicos y muscarínicos. Las moléculas de estímulo se acoplan con su respectivo receptor membranal, que envía su señal a una proteína-G de la adenil ciclase, la proteína G_i , y las de inhibición interactúan con G_o . G_s y G_i comparten una subunidad común cuya acción parece ser crucial para la capacidad integrativa del sistema, y las 2 pertenecen a una familia de proteínas con afinidad por nucleótidos de guanina, entre las que se incluyen la transducina y las proteínas de los genes ras.

TATCHELL, N., ROBINSON, L. G. y HERRINGWELL, H. 1968. *Genetics of S. cerevisiae in relation to growth and proper response to nutrient limitation.* Proc. Natl. Acad. Sci. 62:3795-3797.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene dos genes pertenecientes a la familia de los limedos *PGC1* y *PGC2* cuyas proteínas parecen grandes similitudes estructurales y bioquímicas con las de mamíferos. Puesto que en levaduras se creaban técnicas de manipulación genética difícilmente aplicables en mamíferos se intentó obtener información sobre la función de genes *PGC* en levaduras induciendo una disrupción en el gen *PGC1* para anular su funcionalidad, y se observaron cambios fenotípicos característicos: las células mutantes no se pueden dividir eficientemente en medios con fuentes de carbono no fermentables presentan la hiperacumulación de carbohidratos de almacenamiento como glucógeno y trehalosa, y su esporulación es prematura. Estas mismas características constituyen la respuesta de *S. cerevisiae* en condiciones adversas de falta de nutrientes. Por ello se considera que *PGC* participa en funciones relacionadas con la nutrición, y que la falta de actividad de las proteínas *PGC* actúa en la célula como una señal del exceso de alimento.

TODA, T., UNO. I., ISHIZAWA, T., FUKUDA, S., KAWASAKI, I., BRODE, D., CAMERON, S., BRONKH, S., HALLAGRA, K., WIGLER, H. 1965. In yeast, Ras proteins are controlling elements of Adenylate Cyclase Cell 40:27-36.

Se estudió la posible función de los genes RAS1 en levaduras induciendo mutaciones para inactivarlo y para cambiar el codón 19 por valina, equivalente a la mutación del codón 12 que activa pal de mamíferos. Las células se hicieron crecer en distintos medios de cultivo. En un medio para la esporulación relativamente rico, las mutantes sin RAS2 esporularon bien, pero las RAS2-val-19 esporularon muy pobremente. En medios sin fuentes de azufuro, o nitrógeno, las mutantes RAS2-val-19 perdieron viabilidad con rapidez deteniéndose su desarrollo, y las mutantes RAS2- perdieron viabilidad lentamente, deteniéndose antes de germinar, igual que las levaduras silvestres. Las mutantes RAS2-val-19 no acumularon carbohidratos de reserva al escasear los nutrientes, como lo hacen las normales. Se ha reportado que una mutación en el gene *cyr1* causa la letal para las levaduras, por la falta de actividad de adenil ciclasa, pero una mutación en otro gene, el *bcy1*, suprime esta letalidad. El fenotipo de las mutantes *ras2-val-19* se parece al descrito para las mutantes *cyr1⁻bcy1*. La mutación del gene *rac* que es gran actividad de adenil ciclasa y altos niveles de AMPc. En levaduras con RAS1 y RAS2 inactivos y con la mutación *bcy*, se suprimió la letalidad; las levaduras fueron viables, pero la mitad no germinó, indicando que la mutación *bcy1* no restituye totalmente supresora de la letalidad debida a la disrupción de RAS1 y RAS2. Al medir los niveles de AMPc en las mutantes RAS2-val-19 fueron 4 veces mayores que las normales, las células con RAS1 inactivo tuvieron niveles levemente inferiores a la normal, pero en las células con RAS1 y RAS2 y con la mutación *bcy1*, los niveles fueron 20 veces menores. Las mutantes RAS2-val-19 son insensibles a la falta de nutrientes o son incapaces de responder apropiadamente, sin embargo las células con RAS2 inactivo esporulan prematuramente sólo en medios carentes de glucosa, como si fueran hiper-sensibles a los cambios alimenticios. Es interesante que la incapacidad de respuestas apropiadas a las variaciones alimenticias, sea característica de muchas células de mamífero transformadas. Los fenotipos descritos muestran similitudes entre células con RAS2 inactivo y las mutantes *tyr-1*, así como entre células con la mutación RAS2-val-19 y las mutantes *bcy*. Se concluye que las proteínas RAS1 y RAS2 intervienen en la adenil ciclasa, RAS2 principalmente, pero se ignora a qué nivel, pues no se demostró directamente cual pueda ser su participación.

MARSHALL, H. S., GIBBS, J. B., SCHWARTZ, L. H., STEEL, J. S.
1987. Regulatory function of the Saccharomyces cerevisiae RAS
C-terminus. Mol Cell Biol 7:2309-2319.

Las levaduras con altos niveles de AMPc tienen escasos carbohidratos de reserva como glucógeno, alteraciones en su esporulación y poca viabilidad. Este mismo fenotipo ocurre en levaduras con el gen mutante RAS2-val-19, que corresponde a la mutación en el codón 12 que activa los genes ras de mamífero. Se estudió el papel de los genes KAS en la adenil ciclasa, que regula el AMPc, induciendo una delección en el extremo carboxil de RAS2, del aminoácido 174 al 300 conservando los últimos aminoácidos para la unión membranar; este gen mutante se llamó RAS2A. Se indujeron otras mutaciones, Ala-18, Val-19, en los genes RAS2A. Se insertaron estos mutantes en levaduras y los dos RAS2-Ala-18 Val-19, el completo y el deletado, causaron bajos niveles de glucógeno y de esporulación. La sobre-expresión de ambos genes causó un decremento de la división celular, y una escasa capacidad de la célula para sobrevivir a la falta de nutrientes. El gen CDC25 afecta la cantidad de AMPc en las levaduras y su interrupción resulta mortal, pero al contraefecto, este gen inactivo con las variantes de los genes RAS, se evitó la letalidad, e incluso, los genes H-ras de mamífero, el normal y el oncogénico, también suprimieron la letalidad. Se concluye que el extremo carboxil de RAS2 funciona como un regulador de la actividad de las proteínas RAS2.

FIELD, J., BRUER, D., KATAOKA, T., WISLER, H. 1987. Substrate nucleotide activation of, and competition between, RAS proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 7:2128-2133.

Las proteínas RAS1 y RAS2 de levaduras participan en la regulación de la adenil ciclasa, pero no se ha definido de que manera. Para estudiarlo, se obtuvieron membranas de levaduras para analizar las reacciones de las proteínas RAS2 con GTP y GDP. Un plásmido con el gene CYR1 que codifica la adenil ciclasa, unido a un promotor fuerte, se introdujo en levaduras, que presentaron gran actividad de adenil ciclasa, sus membranas se pusieron en contacto tanto con GDP como con GTP y se midió la cantidad de AMPc generado. Se observó que con GDP, la actividad de adenil ciclasa fue aprox. un 10% de la actividad registrada con GTP. En membranas de levaduras con la mutación RAS-val19 la respuesta fue similar, tanto con GDP como con GTP. Se concluye que las proteínas RAS participan en la adenil ciclasa, si no directamente, sí a un nivel tan cercano como para que en membranas aisladas sigan interactuando y que las proteínas RAS necesitan unirse a GTP para funcionar, es decir, que están en un estado activo similar al de las proteínas-G, durante tanto tiempo como se mantenga la actividad de GTPasa. En p21 oncogénica de mamíferos, dicha actividad suele estar disminuida y si también se requiere del estado activo, tal vez la oncogenicidad se deba a que están activas demasiado tiempo, cumpliendo alguna función que, sostenida, origina la transformación.

UNO, I., NITSUZAWA, H., MATSUNOTO, K., TANAKA, K., OSHIMA, T., ISHIKAWA, T. 1985. Reconstitution of the GTP-dependent adenylate cyclase from products of the yeast CYR1 and RAS2 genes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:7855-7859.

En levaduras, el sistema de la adenil ciclasa consiste en al menos dos componentes proteínicos: Las subunidades catalítica y regulatoria, y está regulado por nucleótidos de guanina en presencia de iones de magnesio; este sistema proporciona AMPc a las células, que funciona como un importante regulador del crecimiento, mediante la activación de proteínas cinasas dependientes de AMPc; el gene CYR1 de levaduras codifica la adenil ciclasa. La subunidad regulatoria regula los nucleótidos de guanina en la subunidad catalítica en presencia de iones magnesio; sin la subunidad regulatoria la actividad de adenil ciclasa de la subunidad catalítica requiere iones manganeso. La proteína RAS2-val-19 genera mutantes con mayor actividad de adenil ciclasa y de AMPc intracelular que las células normales. Se estudió el gene RAS2 introduciendo el gene CYR1 en *Escherichia coli* de la cepa *cyt⁻*, incapaz de producir AMPc y sin actividad de adenil ciclasa; las bacterias presentaron dicha actividad independientemente de GTP, y no produjeron AMPc. Con los genes CYR1 y RAS2 se registró actividad de adenil ciclasa independiente de GTP y gran cantidad de AMPc en las bacterias y con CYR1 y RAS2-val-19 la adenil ciclasa resultó ser independiente de GTP y con una gran cantidad de AMPc. Se concluye que en bacterias CYR1 y RAS2 funcionan como subunidad catalítica y regulatoria respectivamente, y tal vez en *S. cerevisiae* también.

FIELD, J., NIKANO, J.-I., BROOK, D., MACDONALD, B., RODGERS, L., WILSON, I., LEMMER, R., WIGLER, M. 1988. Purification of a RAS-responsive adenyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of a epitope addition method. Mol Cell Biol 8:2157-2165.

En levaduras, la interrupción del gen *CYR* genera mutantes sin actividad de adenil ciclasa y por ello se considera que este gen es quien la codifica, pero la adenil ciclasa de levaduras no se ha caracterizado tanto como en mamíferos porque ha resultado difícil de extraer, y por eso tampoco se ha definido la participación de los genes *RAS*. Para analizarla, se utilizó un método especial para purificar la adenil ciclasa de *S. cerevisiae* mediante un pequeño péptido con una cierta secuencia, que al fusionarse con la proteína, si se generan anticuerpos condicionales contra el péptido, se obtienen anticuerpos contra la proteína en sí. La proteína purificada resultó ser un complejo con múltiples subunidades, tal vez formados por dos copias del producto del gen *CYR* y varias proteínas con un peso molecular de 70 Kd, no identificadas. Ambas proteínas *RAS2* y *RAS2-val19* activaron la adenil ciclasa, en presencia de GTP, pero no con GDP. No se determinó si las proteínas *RAS* ejercen su función activante sobre todo este complejo, o si solamente activan la proteína de 70 Kd, que aun falta identificar.

MBONYI, K., PEULLENS, M., DETREMERIE, K., GEERTS, L., THEVELEIN, J. 1988. Requirement of one functional *RAS* gene and inability of an oncogenic *ras* variant to mediate the glucose-induced cyclic AMP signal in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 8:3051-7.

En las levaduras que están en fase estacionaria, si se añade glucosa se induce una señal de AMPc que genera una cascada de fosforilación de proteínas. Un decremento repentino de pH con algún agente como el dinitrofenol ocasiona la misma respuesta. Para estudiar la posible intervención de las proteínas *RAS*, las levaduras se cultivaron en presencia de glicerol, y se agregó glucosa a las levaduras control, a las mutantes con *RAS1* inactivo, y a mutantes con *RAS2* inactivo, y las 3 presentaron un incremento similar del AMPc. Al agregar dinitrofenol el resultado fue el mismo. En las mutantes con interrupción en ambos genes, y con mutación en el gen *bcyl* que suprime la letalidad, los niveles iniciales de AMPc fueron muy bajos, y no aumentaron con la glucosa. Las proteínas *RAS* parecen ser necesarias para disparar la señal de AMPc, y para saber si son transductoras de la señal o si participan en la adenil ciclasa, se midió el AMPc generado por glucosa a distintas temperaturas; en células control, la respuesta aumenta a mayor temperatura, pero en mutantes con *RAS2* inactivo, a mayor temperatura hubo una respuesta menor. En mutantes *RAS2-val19* la respuesta fue mínima, aunque su nivel de AMPc inicial fue mayor que en células control; en células con *RAS1* inactivo la respuesta apenas fue detectable, y en mutantes *RAS2-val19* con *RAS1* inactivo, se registró la respuesta más débil, tanto con glucosa como con dinitrofenol. Todo indica que la inactivación de genes *RAS* no afecta directamente la adenil ciclasa, sino la señal de AMPc generada con glucosa y dinitrofenol, y que la disminución del pH no actúa sobre la adenil ciclasa, actúa sobre proteínas *RAS*, u otros elementos reguladores previos a la adenil ciclasa.

BECKNER, S. K., HATHORN, L. S., SHIM, J. Y. 1988. The ras oncogene product is not a regulatory component of adenylate cyclase. *Nature* 334:71-72.

Las proteínas p21 de los genes ras tienen similitudes estructurales y bioquímicas con las proteínas G que integran el complejo de la adenil-ciclase, y en las levaduras las proteínas Ras participan en la adenil-ciclase, lo que ha sugerido que posiblemente en células normales de mamíferos, p21 cumpla una función similar. Para averiguar si p21 cumple tal función se extrajeron las membranas citoplasmáticas de células de la línea S49 de linfoma humano, en las cuales, la adenil ciclase tiene deficiencias, pues carecen de la proteína-Gs funcional que es la subunidad reguladora de la adenil ciclase. Se ha observado que las células de la línea MDCK transformadas con el virus de sarcoma de Harvey, al ponerse en contacto con las células S49, muestran la capacidad de suplir las deficiencias de la adenil ciclase. Se cuantificó la concentración de p21 en las membranas de las células MDCK; a las células S49 se les agregó p21 en concentraciones hasta 400 veces mayores a la registrada en células MDCK, y no se detectó estimulación de la adenil ciclase de las S49. También se agregó p21 de eritrocitos humano de v-Ha-ras viral, y de p21 producida en *E. coli*, y no se observaron variaciones en la adenil ciclase. En las células MDCK, la toxina de pertussis afecta la actividad de la proteína-Gi que es la subunidad inhibitoria de la adenil ciclase, y al agregar dicha toxina a las células MDCK se estimula la adenil ciclase. En las células MDCK, se agregó p21 en concentraciones hasta 500 veces mayores a la concentración registrada como normal en las células MDCK de p21, y tampoco se registró ningún cambio, lo que indica que p21 no está relacionada funcionalmente con la proteína-Gs, ni con la proteína-Gi, por lo que se concluye que las proteínas ras no participan en la adenil ciclase en células humanas.

BELL, R. M. 1984. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell 45:631-632.

El diacilglicerol actúa como segundo mensajero intracelular que activa la Proteína-cinasa-C, una serina/treonina-cinasa dependiente de fosfolípidos y calcio. El diacilglicerol (DAG) está implicado en procesos celulares tales como la regulación de la división celular, su diferenciación y secreción, la activación de plaquetas y neutrófilos, la regulación de la expresión genética, de receptores superficiales celulares, del metabolismo celular, etc. Se desconocen los eventos transmembranales que activan al DAG, pero se considera que la señal proviene de una proteína-G, mediante un mecanismo parecido al de la formación de AMPc. Las proteínas de algunos oncogenes (sis, erb-B, ras) se parecen a los elementos involucrados en enviar la señal transmembranal, al respecto se han observado niveles elevados de DAG en las células que expresan ras y sis. Una molécula de DAG activa la Proteína-cinasa-C de manera análoga a los esteres de forbol (EF) que son promotores tumorales potentes, cuya activación es mayor y no son metabolizados rápidamente como el DAG. La proteína-cinasa-C pesa aprox. 80 Kd, in vitro se autofosforila, y se localiza en la membrana. La afinidad membranal está controlada por iones Ca^{++} , DAG y EF. Se propone que la proteína-cinasa-C forma un complejo con Ca^{++} y fosfatidilserina en la membrana. Una señal extracelular interactúa con una secuencia hipotética de reacciones, que involucran una proteína-G y una fosfolipasa-C, que culminan con la degradación del fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) para producir DAG e inositol trisfosfato, que también actúa como segundo mensajero. El DAG entonces se pone en contacto con la proteína-cinasa-C, activándola.

KATBUCHI, K., HIRAOHARA, H., AKIYAMA, K.-I., HATSUNOYO, K. 1986. Possible involvement of RAS encoded proteins in glucose-induced inositolphospholipid turnover. In ~~Membrane and Signal Transduction~~. Proc Natl Acad Sci USA, 83:8170-8176.

Las levaduras representan un buen modelo para estudiar el papel de los genes RAS en la proliferación celular. Durante el ciclo celular, en el paso de la fase G₀ a G₁, posiblemente la clave son los segundos mensajeros como el AMPc, el inositol trifosfato (InsP₃) y el diacilglicerol. La glucosa actúa en levaduras en forma similar a los factores de crecimiento de mamíferos, aumentando el metabolismo de los inositolfosfolípidos, y se ha reportado que tiene un efecto similar en células pancreáticas. Si se cultivan levaduras con glucosa y se les retira de improviso, pierden viabilidad y detienen su división, y si en cambio se les deja un mínimo de glucosa, las células se detienen en el estado pre-germinativo, sin perder viabilidad, y al reagregar glucosa reanudan su división. Las levaduras se pusieron con el mínimo de glucosa, se les agregó inositol marcado radiactivamente y se les reagregó glucosa, para medir la incorporación del inositol, y así registrar el estímulo en el metabolismo. Se generó ácido fosfatídico, fosfatidilinositol, fosfatidilinositol monobesato y fosfatidilinositol dibesato, indicando que la glucosa induce la hidrólisis y la subsecuente resíntesis de inositolfosfolípidos. Mediante Ca⁴⁵ marcado radiactivamente, se observó que la glucosa también estimula la movilización del calcio en el citoplasma. Con fructosa y manosa se obtuvo la misma respuesta, pero no con 2- o 5-oxoglucosa, que estimula la formación de AMPc en levaduras. Las levaduras con RAS1 inactivo, tuvieron una respuesta mayor que las silvestres, y en las mutantes con RAS1 y RAS2 inactivos y la mutación Bay, la respuesta fue aún más intensa. Se concluye que la glucosa posiblemente activa la fosfolipasa-C, que hidroliza los inositolfosfolípidos, y que los genes RAS1 de levadura tal vez intervengan en la regulación de este metabolismo.

SUGIMOTO, Y., NODA, M., KIMURA, H. y INABA, Y. 1984. Possible involvement of two signaling pathways in induction of tumorigenic associated properties by v-Ha-ras gene in PC12 cells. *Int J Cell Biol* 26:12192-12198.

La mayoría de las investigaciones sobre genes ras en amfibios se han hecho en células en proliferación (como fibroblastos), y se ha observado que ras interviene en la proliferación celular. La línea neuronal PC12, en presencia del factor de crecimiento neuronal detiene su proliferación e inicia su diferenciación, que se manifiesta por su supervivencia en ausencia de suero, surgimiento de prominencias y activación de la acetilcolina esterasa. Los virus de Harvey y Kirsten y el oncogeno humano c-Ha-ras inducen una respuesta idéntica, pero no el proto-oncogeno v-Ha-ras. Se estudió esta inducción transfectando células PC12 con un plásmido con v-Ha-ras unido a un promotor viral fuerte, inducible con dexametasona. En la línea resultante, llamada PCMR-B se detectaron pocas copias de v-Ha-ras, pero gran cantidad de p21 y de ARNm del mismo en presencia de dexametasona. Con Ca^{+2} se aceleró el proceso de diferenciación y con Li^{+} se inhibió sin que se alterara el nivel de p21, por lo que estos iones deben actuar a un nivel algo alejado a la expresión de v-Ha-ras. Ca^{+2} varía su concentración al estimularse el metabolismo de los inositolfosfolípidos y Li^{+} inhibe la actividad de la enzima inositol-1-fosfatasa de la misma vía metabólica, por lo que se estudió esta vía. La dexametasona aumentó notablemente los niveles de AMPc, inositol trisfosfato, y diacilglicerol. Tanto el forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), como el di-butilil AMPc (dBAMPc) mimetizan la acción de segundos mensajeros; se estudió el efecto de cada uno y no causaron reacciones, pero al actuar juntos indujeron la diferenciación de células PC12 y en células PCMR-B en presencia de Ca^{+2} indujeron la misma respuesta que la dexametasona sin que variara el nivel de p21, sugiriendo que su efecto no es sobre v-Ha-ras sino que los dos causan los mismos efectos. El efecto de la dexametasona fue reversible indicando que para mantener el fenotipo diferenciado, se necesita la acción sostenida de v-Ha-ras. Se concluye que los diferentes reportes de la acción de genes ras posiblemente varían debido a los distintos tipos celulares, y que es probable ras actúe en niveles previos a la acción de los segundos mensajeros, activándolos indirectamente.

MOLCHAN, A. MARGITA, I. S. 1987. Involvement levels of diacylglycerol and diacylglycerol acyltransferase in membrane synthesis in the mammalian brain. *FEBS LETTERS*.

El metabolismo de los lípidos en el sistema nervioso puede ser un proceso muy complejo por su gran heterogeneidad para ejercer su acción trófica normal. Se demuestra el aumento del nivel de actividad de la diacylglicerol acyltransferase en el cerebro de ratas, pero bien puede ser una proteína que posea la principal función de las proteínas G que no se relaciona con la neurotransmisión. Existen evidencias de que esta proteína participa en la vía de los fosfolípidos y se ha propuesto que su nivel aumenta en la patología de la enfermedad. Para determinar si esta es su función, se transformaron células NIH-3T3 con el virus Mol-MuSV y con el oncogén c-Ha ras. Se cultivaron las células durante la fase exponencial de su crecimiento, para verificar que las células se mantengan durante el experimento, y no puedan adjudicarse a la confluencia celular. Se registró que el nivel de diacylglicerol fue un 100% mayor en células transformadas que en las controladas. Para determinar si esta actividad aumentada de diacylglicerol afecta la actividad total del metabolismo, se tomó como referencia una proteína de 20 kd que es fosforilada por la proteína-quinasa C. En las células control las niveles de fosforilación de la proteína de referencia fueron bajos, pero al estimular las células control con PMA o forbol dibutirato, que son activadores del sistema, se incrementó la fosforilación. En células transformadas, la fosforilación de la proteína de 20 kd fue de 4 a 20 veces mayor que en las controladas. Sin embargo, las células transformadas sólo registraron un leve incremento en la fosforilación en presencia de los activadores. Se concluye que no hay una relación directa entre la activación de la proteína-quinasa C.

BAR-SAGI, D., FERANIGCO, J.-R. 1968. Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. Science 223:1041-1043.

Se investigaron los efectos fenotípicos de los oncogenes ras durante el proceso transformante, en células REF-52 de embrión de rata, de forma plana y poligonal, cuya membrana tiene pliegues pequeños y extensiones cortas y delgadas. 30 minutos después de inyectar p21 del oncogene c-Ha-ras humano, la membrana mostró un activo plegamiento con largas protuberancias; a las 2 horas los largos pliegues membranales formaron elaborados patrones reticulares y a las 10 horas, la célula adquiere una forma algo redondeada con la membrana muy plegada. El plegamiento membranar está muy asociado a la actividad pinocítica, y un criterio de dicha actividad es la incorporación de dextran. Las células inyectadas con p21 oncogénico presentaron numerosas vesículas con dextran, y se calcula que la actividad pinocítica aumentó 10 veces con el oncogene ras, en relación a las normales. La misma reacción se observó en células normales de riñón de rata; p21 proto-oncogénica causó los mismos efectos, pero sólo por 5 horas. El aumento pinocítico, y el plegamiento membranar, se han reportado como los efectos de hormonas, mitógenos y elementos como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). En células cultivadas en ausencia de suero, p21 indujo la misma respuesta pero en células mantenidas en ausencia de calcio por 2 horas antes de la inyección no hubo respuesta, pero si a las células se les agrega calcio 15 minutos después, la respuesta ocurre. La inyección de ras estimula la síntesis de ADN en las mismas condiciones para el aumento de la pinocitosis, pues en las condiciones en que no hubo aumento pinocítico, tampoco la síntesis de ADN se estimuló. Se registró un aumento de las enzimas sintetizadas por la fosfolipasa-A, del metabolismo de los lípidos, por lo que se concluye que ras tal vez estimula la actividad de la fosfolipasa-A.

FLIER, J. S., MUECKLER, M. M., USHER, P., LODISH, H. F. 1987.
Elevated levels of glucose transport and transporter messenger
RNA are induced by ras of src oncogenes. Science 235:1492-1495.

Un rasgo de los más característicos de las células transformadas es la elevada tasa de respiración, de incorporación y de metabolismo de glucosa. Se estudiaron estas alteraciones, transfegando fibroblastos de ratón (células FRT3) con los oncogenes myc, ras y src y se observó el efecto del ester de forbol TPA, un agente tumorigénico que activa la proteína-cinasa-C. En células transfectadas con src y ras se incrementó tanto la tasa del transporte de glucosa como el nivel de su proteína transportadora y del ARNm de esta proteína; con myc no se detectó ninguna respuesta. Esto indica que ras y src tal vez alteran la abundancia, o la estabilidad del ARNm. Las células transfectadas con ras y src proliferan más rápidamente, y su densidad es mayor que en células transfectadas con myc o en las controles. Las proteínas src y ras están en la membrana celular, se parecen a ciertas proteínas transductoras membranales y se ha propuesto que esa puede ser su función, pero si lo fuera, no se explicaría como es que una proteína localizada en membrana como p21, cuya función se considera de tipo metabólica, sea capaz de interferir con otra proteína a nivel transcripcional, en tanto que la proteína myc, localizada en el núcleo y cuya función se considera de tipo regulatorio a nivel de síntesis de ADN, carezca de ésta capacidad. El TPA también incrementó la tasa de transporte de glucosa en células sin transfectar; se registró este aumento a los 15 minutos, sin detectarse cambios en el ARNm, y alcanzó su máximo a las 18 horas, pero al llegar al máximo si hubo aumento en el ARNm. La Proteína-cinasa-C regula el transporte de glucosa y es responsable de su aumento, y el TPA tiene una función mimética del diacilglicerol, activando la proteína-cinasa-C, y estos resultados indican que la acción de p21 mimetiza al TPA, por lo que se concluye que posiblemente ras tenga una función similar al diacilglicerol, y también posea la capacidad de activar la proteína-cinasa-C.

BALLESTER, R., FURTH, M. E., ROSEN, O. M. 1987. Phorbol ester- and Protein kinase C- mediated phosphorylation of the cellular Kirsten ras gene product. *J Biol Chem* 262:2688-2695.

Los carcinógenos químicos como los ésteres de forbol no inducen la proliferación celular, pero aumentan la capacidad de algunos oncogenes para inducirla. Cuando se introduce la proteína oncogénica p21 en células normales, estas responden a la acción del forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), y la transformación celular resulta ser 100% eficiente; sin embargo, las células primarias no se transforman si se introducen oncogenes ras solamente. Se estudió la relación entre PMA y ras, transformando diversos cultivos celulares con p21 de los oncogenes c-Ha-ras c-Ki-ras y N-ras, tanto virales como celulares, agregándoles PMA y midiendo la fosforilación de p21. Sólo en células transformadas con c-Ki-ras, se observó la fosforilación de p21; la proteína fosforilada mostró las mismas propiedades bioquímicas de p21. La fosforilación de p21 in vitro resultó dependiente de la acción de la Proteína-quinasa-C, y el aminoácido fosforilado es la serina 101 del exón IVB de la proteína que codifican los exones I-II-III-IVB del oncogene c-Ki-ras, la serina no se encuentra en esta posición en las proteínas codificadas por otros oncogenes ras celulares ni virales, ni en la proteína que codifican los exones I-II-III-IVA del oncogene c-Ki-ras, pues se encuentra en la región de mayor variabilidad de los genes ras. Esto indica que p21 codificada por c-Ki-ras con el exón IVB es un posible sustrato de la Proteína-quinasa-C, que tal vez participe en la regulación de los genes ras.

YAMATA, T., SULLIVAN, H. B., ROBINSON, M. W. (1987). Altered protein kinase C activity in a subpopulation of cells derived from Ki-MSV transformed cells. *Oncogene* 1:37-46.

En la membrana celular, ocurren eventos para la transducción de señales al interior celular, que pueden estar relacionados con la acción de los oncogenes; dichos eventos se estudiaron en células NIH-3T3 transformadas con el virus de Kirsten (Ki-MSV), de las cuales algunas presentaron reversión al fenotipo normal pero continuaron expresando gran cantidad de proteínas p21 virales, y que resultaron ser resistentes a la retransformación con el Ki-MSV, y con los oncogenes src y ras, indicando que los eventos que generan un fenotipo transformante, pueden bloquearse en un punto distante del punto de acción de los oncogenes ras. Una vía metabólica involucrada en la proliferación celular, es la activación de la Proteína-Cinasa-C; el 12-O-tetradecanoylforbol 13-acetato (TPA), que es un mitógeno, activa la Proteína-Cinasa-C, y también p21 oncogénica, y para saber si ambos actúan mediante intermediarios bioquímicos comunes, lo ideal es trabajar con células con gran cantidad de p21 viral pero resistentes a la transformación. La Proteína-Cinasa-C fosforila una proteína de 50 Kd, con lo que puede cuantificarse, y que tiene actividad fosforilante en la membrana, pero se encuentra también en el citoplasma. Se registró una actividad total de la Proteína-Cinasa-C de 1.8 a 3 veces mayor en las células NIH-3T3 normales que en las transformadas, o las revertantes, y el 68% de esta actividad se presentó en el citoplasma, al igual que en las revertantes, mientras que en las transformadas la actividad citoplasmática fue de 32% y la actividad membranar, de 65%, es decir, aunque las revertantes mantenían la proporción de proteínas activas en membrana, su actividad total fue menor que en las normales. En presencia de factores de crecimiento y TPA que activan la Proteína-Cinasa-C, la proteína de 50 Kd se fosforiló en las NIH-3T3 normales, en las transformadas, se fosforiló con TPA pero no con factores de crecimiento, y en las revertantes no hubo fosforilación en ningún caso. En las revertantes, el nivel del diacilglicerol fue similar que en las normales y menor que en las transformadas. La menor actividad total de la Proteína-Cinasa-C puede deberse a una regulación transcripcional o traduccional, o a que solo unas pocas moléculas de Proteína-Cinasa-C retuvieron la capacidad de ser activadas con diacilglicerol. El que no se fosforilara la proteína de 50 Kd, tal vez se deba a que en las revertantes exista algún inhibidor específico de la proteína de 50 Kd, o a que en estas células la proteína de 50 Kd, tiene alguna alteración que pueda hacerla más susceptible a la acción de fosfatasa. Dado que los niveles de inositol fosfolípidos regresaron a sus niveles originales en las revertantes, no puede descartarse que su estimulación en las células transformadas con oncogenes ras, pueda ser una consecuencia de la transformación, más que una causa.

WAKELAM, M. J. O., DAVIES, G. A., HOUSLAY, M. D., MCKAY, I., MARSHALL, C. J., HALL, H. 1986. Normal p21^{ras} couples bombesin and other growth factor receptors to inositol phosphate production. Nature 323:173-176.

En las células existen numerosos receptores que, al ser activados, estimulan la producción de inositol fosfolípidos; la activación sostenida de esta vía parece ser un factor involucrado en la estimulación de la división celular, y se ha propuesto que algunos oncogenes estimulan la proliferación mediante esta vía. No se conoce la proteína que transduce la señal que inicia esta vía al interior celular, pero debe ser una proteína membranal similar a las proteínas-G, y para averiguar si la proteína desconocida es p21, se construyó un plásmido con el proto-oncogene N-ras humano, unido a un promotor viral regulable con dexametasona (DT), y se introdujo en células NIH-3T3; sin DT, las células expresan mínimas cantidades de p21 de N-ras y con DT, la cantidad es mucho mayor. Las células NIH-3T3 tienen receptores para varios factores de crecimiento. Estas células, con y sin DT, se pusieron en presencia de factores de crecimiento como bombesina, bradiquinina, un péptido gástrico, y suero, y se midió la acumulación de inositol fosfatos. En las células sin DT hubo un leve aumento en la acumulación de inositol fosfatos, en respuesta a los factores de crecimiento, pero en las células con DT y gran cantidad de p21, los factores de crecimiento indujeron gran acumulación de inositol fosfatos, en especial con la bombesina. La respuesta a la bombesina fue dependiente de la cantidad de p21 en la célula, la cual a su vez, fue dependiente de la cantidad de DT agregada a las células, esto es, que la acumulación de inositol fosfolípidos se relaciona con la concentración de p21. No se detectaron cambios en la afinidad del receptor por la bombesina ni en el número de receptores. El que varios factores de crecimiento generen una respuesta en células con gran cantidad de p21, indica que p21 normalmente actúa en un nivel previo al acoplamiento de los diversos receptores con sus factores respectivos, probablemente transduciendo la señal extracelular y cumpliendo la misma función que la proteína-G desconocida, que tal vez sea p21.

KAMATA, I., KUNO, H.-P. 1988. Effects of vas-energetic proteins and platelet derived growth factor on inositol phospholipid turnover in NRK cells. Proc Natl Acad Sci USA 85:5799-5803.

La mayoría de los estudios en los que se ha reportado la participación de ras en el metabolismo de los inositolfosfolípidos, han sido observaciones indirectas hechas in vivo, por lo cual se estudió esta vía metabólica en membranas aisladas, centrándose en el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimula la hidrólisis de inositolfosfolípidos, desencadenando toda la cadena de reacciones de activación de la fosfolipasa C, proteína-quinasa-C, canales de Na^+/H^+ hasta la síntesis de ADM. En las células NIH-3T3 y NRK sin transformar, el PDGF activó el metabolismo, pero en las transformadas con p21 de oncogenes Ha-ras y Ki-ras humanos, el PDGF no indujo ninguna activación. Se ha reportado que un análogo de GTP, aumenta la afinidad de las proteínas-G por nucleótidos de guanina. En membranas aisladas de células NRK se midió el aumento en la vía metabólica con PDGF, que se incrementó con el análogo de GTP, indicando que una proteína-G está transduciendo la señal. Se estudió esta proteína-G con la toxina de pertussis, que inhibe ciertas proteínas-G, y no se observó efecto alguno de la toxina en la estimulación de la vía metabólica, por lo que se concluye que en la vía de los inositolfosfolípidos, la proteína encargada de transducir la señal es una proteína-G, insensible a la toxina de pertussis, que no puede ser p21, y que el PDGF y los genes ras ejercen sus efectos sobre la vía de los inositolfosfolípidos mediante mecanismos diferentes.

ADARI, H., LEWY, D. R., WILLOENSEN, B. M., BER, C. J. y MCCOYRICK, P. 1988. Guanosine triphosphate activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector domain. *Science* 240:518-521.

Las proteínas ras posiblemente tengan una función transductora, pues son similares a las proteínas-G, que están activas transmitiendo señales al interior celular estando acopladas a GTP y se inactivan cuando ellas mismas hidrolizan el GTP quedando unidas a GDP. Se estudiaron tejidos normales, humanos y de ratón, líneas de células no transformadas, líneas celulares tumorales humanas y líneas celulares establecidas, que se transformaron. En todas se detectó una proteína llamada proteína activadora de GTPasa o GAP, que aumenta hasta más de 100 veces, la actividad de GTPasa de p21 normal. Se hicieron extractos citoplasmáticos para medir la actividad de GTPasa de distintas proteínas p21, y se observó que en p21 de H-ras, K-ras y N-ras el extracto incrementó la actividad, pero no en proteínas virales, por lo que el sitio de acoplamiento de GAP a p21 ha de estar en las regiones compartidas por proteínas H-ras y K-ras. El anticuerpo Y13-259 inhibió la actividad de GTPasa, tal vez impidiendo el acoplamiento GAP-p21. Se deletaron las regiones no esenciales para las funciones bioquímicas de ras, incluyendo la región carboxilo terminal, y el aminoácido Cys-195, necesario para la unión membranal, y GAP siguió estimulando la actividad de GTPasa de p21. Las mutaciones en los codones 12, 59 y 61 suprimieron la acción de GAP sobre p21, y también las mutaciones en los codones 35, 36, y 37; estos últimos codones pertenecen a una de las regiones expuestas de p21 pero las mutaciones en los codones 12, 59 y 61, tal vez ocasionen una alteración conformacional. Se propone que GAP es la proteína efectora de p21, que regula su acción, y que es más probable que su efecto sea sobre p21 y no que p21 actúe sobre GAP, de esta manera las mutaciones puntuales transformantes de p21 pueden impedir que GAP pueda seguir regulando la función de p21, lo que trae como consecuencia el desajuste del cadenciamiento de los procesos de transformación.

ONCOGENES RAS EN TRANSFORMACION CELULAR

En los últimos años celulares, principalmente en células de mamífero, se han hecho numerosos estudios sobre la acción transformante de los oncogenes ras, ya sea mediante la microinyección de plásmidos ras obtenidos principalmente en bacterias para estudiar el efecto de p21 en la célula, aunque esto es muy limitado, no pueden microinyectarse muchas células a la vez, y no todos los tipos de células son susceptibles de ser transformadas en esta forma las más aptas son las fibroblásticas pero es útil si lo importante es la cantidad de proteína microinyectada. La introducción de plásmidos con secuencias de oncogenes ras directamente en las células permite que las mismas células expresen proteínas ras sin embargo para asegurarse que el plásmido entra en la célula se suelen utilizar las secuencias propias del plásmido que confieren resistencia a los antibióticos y se agregan antibióticos a las células lo que puede alterar las reacciones celulares, pero es útil cuando en el plásmido se inserta un promotor fuerte para expresar p21 en gran cantidad o un promotor regulable con algún factor externo, para observar los efectos de su activación e inactivación. La infección con virus de sarcoma murino de Harvey, de Kirsten, y SV40 permite transformar mayor diversidad de células, pero los resultados indican el efecto de oncogenes virales, no celulares, los que son muy parecidos y la infección en sí puede alterar las células y los resultados. Los oncogenes ras propios de las células se pueden activar también con ciertos agentes carcinógenos químicos o físicos, como radiaciones. Con estos métodos se ha obtenido información muy importante.

Los oncogenes ras se expresan de manera dominante con respecto a sus respectivos proto-oncogenes para al ser transfectados en una célula, los alelos normales del proto-oncogene ras de la célula, no se expresan de tal manera que impidan la expresión del fenotipo transformante del oncogene ras introducido. Con los oncogenes ras no pueden transformarse células primarias, recién obtenidas de un organismo, solo líneas de células no transformadas pero establecidas como la línea NIH-3T3. Las células humanas no parecen ser muy susceptibles a la transformación por oncogenes ras, por ello no se ha trabajado mucho con ellas (Vasson y cols., 1985).

La expresión continua de genes ras es necesaria para iniciar y mantener el fenotipo transformante como se ha observado en células transformadas con oncogenes ras en las que se ha inducido una reversión al fenotipo normal, ya sea con anticodina (Mullova, cols 1984) o con anticuerpos anti-p21 (Kang y cols., 1986, ver pag 107) sin embargo con no se ha determinado totalmente si la activación de ras es lo que desorganiza la transformación, o si es una consecuencia, y en todo caso, si su participación ocurre en las primeras etapas de la carcinogénesis o en las últimas. El hecho de que ras transforma células NIH-3T3, que ya están inmortalizadas, pero difícilmente transforma células primarias puede indicar que se requieren ciertos eventos previos que inmortalizan las células para que ras complete el proceso transformante. Esta hipótesis también ha surgido en los trabajos donde ras complementa la acción de carcinógenos químicos que inmortalizan las células sin transformarlas (Storer y cols., 1986) pero existen otras evidencias de que la ag

tivacion de ras puede ser un evento que de inicio a la carcinogenesis, como se ha visto induciendo tumores en animales.

Las celulas transformadas se distinguen por varios criterios. Son inmortales, presentan un crecimiento caracteristico pues a diferencia de las celulas normales que generalmente crecen en monocapa en las cajas petri las celulas transformadas crecen formando paquetes o focos de celulas, pues pierden la capacidad de inhibicion por contacto, proliferan independientemente en ciertas condiciones restrictivas para las celulas normales, como algunos tipos de agar no responden a las seÑales que normalmente regulan la proliferacion celular presentan alteraciones fenotipicas aumentan su requerimiento de glucosa, y su metabolismo en general. Las celulas transformadas con oncogenes ras presentan ademas de los anteriores cambios tales como el crecimiento independiente de seÑales regulatorias hormonales (Kasid y cols., 1985), alteraciones en los canales de Ca⁺⁺ (Chen y cols., 1988), y tambien un aumento en la resistencia a los efectos de la radiacion ionizante (Sklar, 1988) asi como una expresion selectiva de ciertos genes que estaban inactivos en la celula antes de la transformacion (Owen y Ostrowski 1987).

Los oncogenes ras participan tanto en la proliferacion celular (Feramisco y cols., 1984; Feig y cols., 1988, ver pag 103 como en la diferenciacion, esto ultimo se ha observado en la linea PC12 de feocromocitoma de rata, cuya diferenciacion se induce con el factor de crecimiento neuronal (NGF); en las celulas PC12, p21 oncogenica induce la misma reaccion de diferenciacion (Bar-Sagi y Feramisco, 1985). En las celulas PC12 diferenciadas, al agregar anticuerpos anti-p21 se revierte el proceso de diferenciacion aun cuando este no se haya inducido con p21 (Hagag y cols., 1985), y las celulas nuevamente adquieren su fenotipo indiferenciado. ras tambien participa en la diferenciacion de los mioblastos esqueleticos (Olson y cols., 1987). En ovocitos de *Xenopus laevis* los oncogenes ras pueden inducir la meiosis (Birchmeier y cols., 1985); en estos ovocitos la insulina normalmente regula la maduracion pero p21 interfiere con dicha regulacion (Korn y cols., 1987). En keratinocitos de raton p21 oncogenica altera el patron de diferenciacion y tiene la capacidad de suplementar los requerimientos de los factores de crecimiento de las celulas (Weissman y Aaronson, 1985). Existen evidencias de que p21 oncogenica puede suplementar las deficiencias en la expresion de genes MLA clase II en celulas mutantes que no expresan dichos genes (Hume y cols., 1987). En celulas de tumor mamario, los oncogenes ras incrementan las interacciones celulares con la matriz de la (Miller y cols., 1988).

Los oncogenes ras participan en el ciclo celular, en la entrada a la fase S, en la salida del ciclo por anti-p21 (Hagag y cols., 1985) celular antes de la fase G₂ (Furumasa y cols., 1988) que cuando las celulas han pasado a la fase G₂ los oncogenes ras ya no interfieren (Durtin y Whitfield, 1984), aunque al parecer la expresion de ras no varia durante el ciclo celular (Andreeff y cols., 1986). No se han logrado identificar las interacciones que establece p21 con otras moleculas intracelulares, aunque parece ser que participa en la regulacion del factor transformante de crecimiento tipo (Racker y cols., 1985).

Se desconoce realmente que interaccionan las proteínas oncogénicas ras transformadas con las células para la transformación celular en una célula con la capacidad proliferativa que se tienen a veces en ciertos tipos de células, tales como fibroblastos, células de músculo, pines y bioquímicos dentro de la célula, y el establecimiento del fenotipo maligno.

COOPERATIVIDAD ENTRE ONCOGENES

Se ha observado que la acción conjunta de ras con uno de los genes intracelulares oncogénicos, tal como de los oncogenes cooperantes, posiblemente debido a que los otros oncogenes actúan en diferentes fases del proceso tumorigénico, complementando la acción de ras. Se ha reportado que existe cooperatividad entre los oncogenes ras y c-Ha (Liu y cols., 1986) así como entre ras y H-ras (Marandoukas y cols., 1985, 1986) y la gástrica E1a de adenovirus (Veldrich y Ziff, 1985) el antígeno-f del virus SV40 (Sagawa y Yamaguchi, 1987) y del virus de polipoma (Nasylyk y cols., 1987) también con las secuencias transformantes de los virus del papiloma (Mintashouski y cols., 1987). Además, los oncogenes ras parecen inducir la expresión de c-fos (Stacey y cols., 1987) y existe una interacción entre p21 oncogénica y las proteínas de receptores relacionados con factores de crecimiento celular o con sus receptores, como son el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Weissman y Aaronson, 1985, ver pag 153) codificado por el oncogene erb-B, y el factor de crecimiento transformante tipo II (Lisof y cols., 1987). El anticuerpo Y13-157, además de ejercer un efecto inactivante sobre p21, también interfiere con la capacidad transformante de otros oncogenes como src, ras, fms, y dicho efecto es aun mayor sobre la capacidad transformante del virus de papiloma (Smith y cols., 1986). Respecto al sitio de inserción de ras, en el genoma en células embrionarias de rata transformadas con oncogenes ras, la secuencia del oncogene cellular se inserta de manera preferencial en un mismo sitio, en el cromosoma 3 de rata, indicando que posiblemente su inserción en ese preciso sitio, es un evento decisivo para su oncogenicidad (McKenna y cols., 1988).

PERTINENCIA DE ONCOGENES RAS EN LA METASTASIS

Entre las fases del proceso transformante una de las últimas es la metastasis que puede o no desarrollarse en una célula maligna sin embargo se ignora si las células tumorales requieren de algún cambio que las haga metastásicas o si ya tienen la capacidad, que en algunas células se expresa y en otras no. No se ha definido si existe una intervención directa de los oncogenes ras en la capacidad metastásica de las células malignas pero existen evidencias de que ras interviene en la agresividad metastásica de células malignas (Wagner y cols., 1987). Entre las propiedades de las células metastásicas está su capacidad para invadir nuevos sitios, escapando de las barreras inmunológicas, y también los cambios estructurales de sus carbohidratos membranales; es muy probable que estas dos propiedades estén relacionadas (Albini y cols.,

1986, ver pag 155), pues uno de los primeros eventos que ocurren en una célula en proceso de transformación, es el cambio estructural de los carbohidratos de su membrana (Dotto et al., 1983). Es probable que ras intervenga en dichos cambios, pues p19 es una proteína membranal que al estar activada, puede ocasionar cambios en su entorno membranar, incluyendo los carbohidratos, este puede ser la posible participación de ras en la metastasis.

ANTI ONCOGENES

En la célula existen mecanismos para tratar de evitar un proceso transformante que está ocurriendo pero eso aun es muy poco lo que se conoce al respecto. En las células malignas de linfomas y leucemias, el tratamiento con glucocorticoides ocasiona la muerte celular, al parecer involucrando que se inhiba la expresión de oncogenes activos en estas células (Eastman-Ricks y Vedeckis, 1986).

En la célula existen genes llamados antioncogenes, que son alelos normales de ciertos genes recesivos que normalmente en presencia del alelo normal no se expresan pero faltando el alelo normal originan una carcinogenesis (Knudson, 1985). Sin embargo también se consideran antioncogenes aquellos genes cuya expresión impide la expresión del genotipo transformante de un gene sea o no sus alelos normales. Algunas evidencias indican que existen antioncogenes, en células transformadas con oncogenes ras, en las que se ha logrado revertir la transformación, recuperándose el fenotipo normal, de varias maneras: Con metionina, con los anticuerpos anti-ras (Feramisco y cols., 1985), con interferón (Sawid y cols., 1987), e inclusive con alelos normales de ras de especies diferentes (Schaefer y cols., 1988). Los efectos de células normales que circundan las células transformadas con oncogenes ras que inhiben la expresión de la oncogenicidad (Dotto y cols., 1983) igualmente la fusión de células normales y transformadas, donde las células fusionadas resultantes expresan un fenotipo normal, e incluso carecen de un alelo, sugiriendo que ese alelo participa en la transformación y/o reversión (Oshimura y cols., 1983), son evidencias de que en las células normales existen elementos supresores de la oncogenicidad de ras. De nuevo en levaduras *S. cerevisiae* se han encontrado valiosos resultados con la identificación de uno de los genes supresores llamado RAS1 por RAS y factor-1 de maduración, que al parecer codifica la enzima responsable de la unión del lípido a la proteína RAS (Fowers y cols., 1986). El estudio de los genes ras en las células, eventualmente permitirá desentrañar los complicados mecanismos que controlan una célula normal de una célula maligna, y por lo tanto, al estudio de la supresión o reversión del proceso tumorigénico.

YOSAKI, G. M., LECHNER, J. R., BRORIELSON, G. W., KURBA, B. E.,
MALAM-GIBLEY, L., WILLEY, J. C., VALERIE, M. P., CHANDLEDIN, M.
M., TRUMP, M. P. y MARAVIS, L. C. 1970. Transformation of human
bronchial epithelial cells transduced by Harvey ras oncogene.
Science 171:1179-1179

El estudio de los oncogenes y se no ha realizado principalmente
la por transfeccion en celulas NIH-3T3 de esta, pues los intentos
por transformar celulas humanas con la misma tecnica no han resul-
tado igualmente exitosas; sin embargo, es importante estudiar los
procesos tumorigenicos en celulas humanas dada la importancia cli-
nica del cancer. Para esto se analizaron las muestras de un hom-
bre muerto accidentalmente, de celulas de epitelio bronquial pues
en este tipo de celulas ocurren la mayoria de los tumores pulmona-
res. Estas celulas se llamaron HBE3 en las transfecciones ADN del on-
cogene viral v-Ha-ras se cultivaron con suero sanguineo o TPA que
inducen la diferenciacion, y se seleccionaron las que no se dife-
rencian, por haber incorporado al oncogene. Las celulas normales
se diferenciaron en 7 dias, y las transformadas, en iguales condi-
ciones, permanecieron sin diferenciarse, y a los 3 meses murieron
excepto algunas que se llamaron celulas HBE-1; estas ultimas cel-
las se inyectaron en 16 ratones en 2 de los cuales se presentaron
pequenos nodulos que crecieron en 14 dias, pero 7-9 meses des-
pues, los 2 ratones desarrollaron tumores. Las celulas de estos
tumores se inyectaron en otros 14 ratones, y 13 desarrollaron tu-
mores con rapidez sin reversión de ninguno. Las celulas de estos
segundos tumores presentaron características de celulas poco dife-
renciadas. Despues de varios pasajes celulares, las celulas fue-
ron malignizandose, si bien pocas lo hicieron, y aunque al princi-
pio algunas celulas no indujeron tumores, los tumores que desarro-
llaron despues indican que el oncogene estaba actuando aunque len-
tamente. Las celulas humanas resultaron ser un tanto dificiles de
transformar, y se concluye que se requieren varios pasos para que
se desarrolle la oncogenicidad.

HILLOVA, J., HILL, H., BELSHADNEY, W. D., MORISON-SPANSON, R. y
SWAN, L. 1986. Loss of the oncogene *ras* from human bladder carcinoma
transfected NIH-3T3 cells grown in the presence of methionine.
J Natl Can Inst 77:721-731.

Las células NIH-3T3 transfectadas con *ras* de la línea 124 Ig
mana tienen al oncogene *ras* ya integrado en su genoma, y mues-
tran un fenotipo transformante. Si cultivar estas células en un
medio con exceso de metionina las células reversionaron al fenotipo
original, al mismo que tenían antes de la transfección, pero con-
servaron la misma viabilidad que antes de la reversión. Después
de varios días, cada vez se encontraban menos células que retavi-
ran al oncogene *c-Ha-ras* humano, hasta que no se encontró ninguna
aun cuando la metionina se retiró del medio de cultivo después de
105 días, en ninguna célula se detectó el oncogene después de 105
días, y las células no regresaron al fenotipo transformante al re-
tirarles la metionina. Se inyectó ADN de células transfectadas,
con y sin tratamiento con metionina, en ratones. Las células sin
tratamiento de metionina originaron tumores en todos los casos, y
las células tratadas con metionina indujeron tumores en un 50% de
los casos. Se desconoce el mecanismo por el cual la metionina pug-
na interferir con el proceso transformante, pero posiblemente ocu-
rra mediante la interacción con la proteína oncogénica p21 de *ras*.

STORER, R. D., STEIN, R. S., STRA, J. F., DELUCA, S. G., ALLEN, H.
L. y BRADLEY, O. 1986. Malignant transformation of a preneoplastic
hamster epidermal cell line by the *ES* *c-Ha-ras* oncogene. *Can Res*
46:1458-1464.

Durante el proceso transformante existen cuando menos 2 even-
tos críticos, la immortalización o establecimiento de células pri-
marias en cultivo, y la conversión de las células establecidas al
fenotipo transformante. Para investigar la participación de los
oncogenes *ras* en el proceso, las células epiteliales primarias de
hamster, que generalmente se diferencian a las 4 semanas en culti-
vo en trabajos usas con *N*-metyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidina y las
otras con benzo(a)pireno (BPNE y BP) estableciéndose líneas de cé-
lulas immortalizadas pero no transformadas con una activa prolif-
ración y pérdida de la capacidad de diferenciarse que no transfor-
maron células NIH-3T3, indicando la falta de activación de onco-
genes *ras*. En estas células se transfectó un plásmido con el onco-
gene humano *c-Ha-ras*, con mutación del codón 12, y las transfecta-
das si transformaron las células NIH-3T3, además de que indujeron
carcinomas en ratones por lo que se concluye que la activación de
ras puede actuar como un evento complementario a un proceso trans-
formante que previamente se ha iniciado.

WELSH, M., WATKINS, M. W., REYNOLDS, M. C., AND D. R. GELBERG.
C. R. 1983. Transfection of NIH 3T3 cells with human breast
cancer cells hypoxanthine dependent on oncogenes for tumorigenicity.
Science 221:725-728.

Una característica de las células transfectadas es la proli-
feración irrestricta, que no responde a los señales que normalmente
regulan la proliferación de células normales. Las células de
la línea MCF-7 de cáncer mamario humano proliferan en un medio lí-
bro de estrógenos pero proliferan más rápidamente en presencia de
estrógenos. Cuando se implantan las células MCF-7 en ratones, re-
sultan tumorigénicas solo en presencia de estrógenos, pues en rato-
nes a los que se extirpan las glándulas sexuales, no hay desarrollo
tumoral. Se estudió la relación de este fenotipo con la acti-
vación del oncogene ras, transfiriendo el oncogene viral v-ha-ras
en células MCF-7 y se caracterizaron las transformantes, las cua-
les expresaron mRNA de v-ha-ras y p21 viral. A diferencia de las
células de la línea parental, las transfectadas mostraron un indig-
namente mínimo en su ritmo de proliferación en presencia de estróge-
nos y al inyectarlas en ratones, las transfectantes indujeron tumor-
res en ratones normales, en los machos de glándulas sexuales, y
en los carentes de glándulas, pero con hormonas estrogénicas, que
les fueron inyectadas. Se demostró así que las células con oncog-
enes ras activos, no responden a los señales hormonales encarga-
das de regular la proliferación celular en condiciones normales.

CHEN, C., CONBLEY, M. J., ROBERTS, T. N., MISS, F. 1988. Voltage sensitive calcium channels in normal and transformed 3T3 fibroblasts. Science 239:1024-1026.

Durante la proliferación celular los iones Ca^{++} tienen un importante papel regulatorio, y en los fibroblastos es donde más se suele estudiar la proliferación; sin embargo, no se sabe mucho sobre los mecanismos que regulan los iones Ca^{++} intracelulares. Por medio de técnicas de medición de voltaje, se detectaron dos tipos de canales de Ca^{++} en fibroblastos 3T3, unos que mantienen un flujo continuo de iones al interior de las células, y otros que generan un flujo momentáneo, de escasos milisegundos. Ambos tipos de canales se han descrito en neuronas, células de músculo cardíaco, de músculo liso y células de la pituitaria. También se registraron canales de potasio, cloro y canales no selectivos. Se ignora cuál sea la función de ambos tipos de canales de Ca^{++} , pero probablemente interactúen con procesos sensibles a Ca^{++} , tales como el control de la secreción, cambios celulares de forma, movilidad, y fagocitosis. Se estudiaron los canales de Ca^{++} en los fibroblastos transformados con el oncogene c-H-ras, v-fms y el antígeno-T de polioma, y se observó que los canales continuos de Ca^{++} son iguales que en las células sin transformar, pero en células transformadas, no se detectaron los canales transitorios. Posiblemente la transformación morfológica interfiera con la función de estos canales, o bien tal vez los oncogenes ras inhiban su inducción. Tanto el antígeno-T como la proteína del oncogene fms, tienen actividad de tirosina-kinasas y p21-ras tiene otras funciones bioquímicas, por lo que se concluye que debe existir alguna vía común para que estos diferentes oncogenes, supriman los canales transitorios de Ca^{++} , lo que tal vez sea un evento determinante para que se lleguen a cabo los cambios que ocurren durante la transformación.

SKLAR, M. D. 1988. The ras oncogene and cell growth factor resistance of NIH-3T3 cells to ionizing radiation. Science 239:645-649.

Las radiaciones ionizantes afectan al genoma celular; por ello se investigó de qué manera las células sobrevivían estos daños, estudiando genes que participan en los procesos celulares, que intervengan al ADN, como los oncogenes. La resistencia de las células NIH-3T3 a las radiaciones ionizantes, es similar a la de células humanas en general, respecto al porcentaje de células muertas al exponerlas a la radiación por eso se transfirieron las NIH-3T3 con el virus de Kirsten y algunas mostraron reversiones al fenotipo normal, pero expresando p21 viral. Se transfirieron las NIH-3T3 con el oncogene c-Ha-ras con mutación del codón 12, del codón 61, y con N-ras con mutación del codón 12 estas células se expusieron a la radiación del ⁶⁰Co, y todas presentaron la misma resistencia a la radiación, significativamente mayor que las células sin transfectar. Se transfirieron células con un plásmido con el proto-oncogene v-ras, unido a un promotor viral fuerte, que expresaron gran cantidad de p21 proto-oncogénica, y otras células con el oncogene v-ras, y ambas tuvieron menor resistencia incluso, que las NIH-3T3 sin transfectar. Las reversiones tuvieron igual resistencia a la radiación que las primeras, indicando que ras confiere resistencia aun sin inducir alteración fenotípica, lo que demuestra que la resistencia se debe a las genes, no a la transformación como tal. La radiación afecta de diferente manera a las células, según la fase del ciclo celular, por lo que se radiaron células en distintas fases del ciclo celular, sin encontrar diferencias significativas en la resistencia de células en distintas fases del ciclo celular. Se concluye que los genes que ejercen sus funciones en la membrana, afectan los mecanismos de reparación del ADN, aun sin actuar sobre él, indirectamente, tal vez regulando la activación de genes de reparación, o por medio de un cambio conformacional del ADN o de los cromosomas.

OWEN, A., INFRANGLIA, M. G. 1987. Rapid and selective alterations in the expression of cellular genes accompany additional transactivation of H-ras in NIH-3T3 cells. *Mol Cell Biol* 7:2310-2320

Los oncogenes transducen señales quimiotácticas estimulando o reprimiendo genes regulables. Para determinar si los oncogenes ras utilizan esta vía de acción se inyectó en células NIH-3T3 un plasmido con el oncogene viral v-src, clonado a la región promotora del virus de Nueva Gales del Sur (NSV), regulable con esteroides. Las células se diferenciaron en presencia de esteroides, y al retirarlas reversiones al fenotipo normal. Las células transfectoradas expresaron gran cantidad de ARN de virus ras como de inhibición por contacto, y adquirieron la capacidad de proliferar en medios semisólidos. La mayor expresión del ARN estimulada con hormonas se registró a las 1-4 horas, se mantuvo por 1-3 horas y de grado a las 12-14 horas del tratamiento hormonal, indicando que el gran mecanismo celular regula la respuesta al estímulo. No registraron los genes alterados durante esta época y se concentraron en el oncogene ras, que codifica el factor de crecimiento epidérmico, y la secuencia NLS-3; similar a las secuencias virales. Los niveles de ARN de genes de acción semisólidos, aunque la regulación de sí mismos fue de tipo post-transcripcional y en NLS-3, fue transcripcional. No se registró ningún cambio en el nivel de c-fos. Se concluye que ras interactúa con la función de los factores de crecimiento, regulando los cambios bioquímicos que originan la transformación.

FERRACINO, J. R., CROSS, H., KASRAB, Y., ROSENBERG, M., SWEET, R. W. 1984. Microinjection of the oncogene form of the human H-ras (V29) protein results in a rapid proliferation of quiescent cells. *Cell* 36:107-117.

En *Es coli* se produjeron proteínas p21, tanto p21 oncogénica como protooncogénica, que se inyectaron en características bioquímicas originales. En células NIH-3T3, ARN de simión de rata, NIH-3T3 (fibroblastos de ratón), y H-1 (fibroblastos humanos), mantenidas en la fase G0 del ciclo celular por falta de nutrientes, se microinyectaron tanto la proteína rasal como la oncogénica. Algunas horas después de la microinyección la proteína oncogénica produjo notables cambios morfológicos, así como un aumento en la síntesis de ADN y en la proliferación celular en todas las células, excepto en las humanas que no registraron ninguna reacción con el cultivo. Al microinyectar células con cantidades similares de p21 oncogénica se observaron muy pocos cambios en la morfología celular. Después de 24 horas, las células microinyectadas con p21 oncogénica se reversiones a su estado original, posiblemente por haber finalizado la acción de p21. Se concluye que p21 de los oncogenes ras, tiene similitudes funcionales con la proliferación celular.

256-5601, D., HIGUCHI, H. y. 1985. Microinjection of the ras oncogene protein into PC12 cells induces morphological differentiation. Cell 41:241-249.

Se ha reportado que las proteínas ras participan en la proliferación, pero para averiguar en que otros procesos celulares participan, se estudiaron las células PC12 de fenocitosomas de rata, de forma madura y que proliferan indefinidamente en cultivo. Al agregarles el factor de crecimiento neuronal (NGF), después de 24 horas adquieren una forma plana, hacen pequeñas prolongaciones y después de varios días dejan de proliferar y se diferencian, formando largas prolongaciones. Se microinyectaron células PC12 con p21 oncogénica y les sucedió lo mismo que con NGF, aunque el proceso fue más rápido, en solo 13 horas, pero a las 20 horas empezó un proceso de reversión que se completó a las 100 horas. Con p21 proto-oncogénica no ocurrió nada de lo anterior. Se desconoce el mecanismo por el cual NGF induce la diferenciación, pero al ser un factor de crecimiento, debe actuar a nivel de receptores, debe requerir la síntesis de proteínas, y la continua presencia del NGF. Se obtiene los mismos cambios en células análogas al AMPc que inducen la diferenciación en pocas horas, la cual revierte rápidamente al retirarse el análogo de AMPc, y por ello, se descarta la posibilidad de que p21 actúe mediante cambios de AMPc en las células; mas bien parece que ambos, los análogos de AMPc y p21 actúan de diferente manera. Se concluye que la respuesta de las células a los oncogenes ras, depende en gran medida del tipo de célula.

HACAO, N., HALEBUJA, S., VIOLA, M. 1984. Inhibition of growth factor-induced differentiation of PC12 cells by microinjection of antibody to ras p21. Nature 319:680-682.

Se investigó la función de p21 en la diferenciación celular, microinyectando anticuerpos anti-p21 en células PC12 inmediatamente después del tratamiento con NGF, y se observó un efecto inhibitorio de la diferenciación. Se les inyectó el anticuerpo Y13-259 que inhibió la diferenciación durante las primeras 40 horas, después de este tiempo se inició la diferenciación de las células, y a los 3 días estaban totalmente diferenciadas. Se inyectó el anticuerpo al empezar la diferenciación inducida con NGF, este proceso se interrumpió e incluso se revirtió a las 2-12 horas, y se re inició a las 24 horas. Aunque se ignora de que manera el NGF induce la diferenciación, se sabe que una vez diferenciadas, las células PC12 adquieren el fenotipo de neuronas; este fenotipo incluye el almacenamiento de neurotransmisores y el desarrollo del potencial de acción dependiente de Na^+ por lo tanto es posible que los oncogenes ras participen en estos procesos.

OLSON, E. N., SPITZ, G., TAINSKY, M. A. 1987. The oncogenic forms of N-ras or H-ras prevent skeletal myoblast differentiation. *Mol Cell Biol* 7:2104-2111.

Las células del músculo esquelético, al diferenciarse, dejan de proliferar y se fusionan formando miofibros multinucleados, activándose los genes que codifican proteínas específicas musculares, como la isoenzima muscular de la creatina cinasa (MCK) y el receptor de acetilcolina nicotínico (ACh). Antes de diferenciarse, su forma es plana, estrellada y crecen con suero fetal de ternera, y al transferirlas a un medio con suero de caballo en bajas cantidades se induce su diferenciación, la cual es inhibida por el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y por el factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF β) pero se ignora en qué manera lo inducen. Para investigarlo se observaron los efectos de los oncogenes ras, cuya función se considera de tipo transductora de señales extracelulares. Se transfectaron las células con los proto-oncogenes y con oncogenes N-ras y c-Ha-ras con mutación del codón 12, se transfirieron al suero de caballo, y las transfectadas con los oncogenes c-Ha-ras y N-ras no se fusionaron ni expresaron los genes MCK ni el ACh, sólo en una transfectada con H-ras se indujo una incipiente diferenciación, y con N-ras, ninguna, indicando tal vez que N-ras es un inhibidor más potente. Con el suero fetal se obtuvo la misma respuesta, que por lo visto se produjo independientemente de los factores de crecimiento. El hecho de que no se detectaran los genes de células diferenciadas, indica que ras interfiere con los primeros eventos de la diferenciación. No se registró la misma respuesta con el proto-oncogene c-Ha-ras. Se concluye que la acción de los oncogenes ras ocurre en un nivel que afecta la regulación celular inducida por los factores de crecimiento.

BIRCHMELT, U., BRODEK, D. y WITLER, M. 1984. Ras Proteína con induce meiosis in *Xenopus laevis*. Cell 43:1315-1321.

En levaduras p21 participa en la adenil ciclasa y se investiga si también cumplen esta función en ovocitos de *Xenopus laevis*, que son grandes y fáciles de microinyectar, además de que sus cambios se detectan fácilmente y poseen adenil ciclasa que consta de las proteínas- α y β , inhibidas con la toxina del cólera y la toxina de pertussis, respectivamente. La meiosis, o sea la maduración la regula el AMPc, cuya disminución es de los primeros eventos en la meiosis. Los ovocitos, al ser atiripados quirúrgicamente del organismo de *X. laevis* quedan detenidos en la profase de la meiosis, la cual se completa in vitro con progesterona, insulina, y EGF-1, y se inhibe con la toxina del cólera, fosfodiesterasa, y la subunidad catalítica de la adenil ciclasa. En los ovocitos se microinyectaron proteínas p21 normal y oncogénica, producidas en bacterias, y ambas indujeron la meiosis en un tiempo mayor que la progesterona. Con 10 ng de caso p21, se indujo la maduración del 94% de los ovocitos, y con 400 ng de p21 normal, maduro el 83% de los ovocitos. Con cantidades mayores a los 20 ng de oncogénica los ovocitos degeneraron lo cual no ocurrió con p21 normal aun en cantidades altas; la maduración inducida con p21, se provocó ningún descenso en el nivel del AMPc. La toxina del cólera inhibió solo en parte la inducción con p21. En células de mamífero p21 constituye un 0.005 de la proteína total y en los ovocitos de *X. laevis* se inyectó el equivalente al 0.0035% de la proteína total celular de *X. laevis*, que por lo tanto, resulta ser un sensible indicador de la función de p21. Al inyectar en los ovocitos p21 con progesterona conjuntamente se aceleró el tiempo de inducción de la maduración; este mismo efecto ha sido reportado con el oncogénico *v-src* sin embargo *v-src* no induce la maduración por sí solo. Al no variar el AMPc durante la inducción de la maduración con p21, ha de haber otra vía para inducir la maduración que no requiera al AMPc por lo tanto es poco probable que la variación del AMPc sea la señal de inicio de la maduración. Se concluye que en *X. laevis* p21 participa en la maduración y no en la adenil ciclasa.

MORN, C. J., GIERCK, C. W., HODGKINSON, E. y BETH, S. A. 1997. Ras p21 es el potencial modificador de Insulina activa la *Neovagus acylus*. Science 275:1490-1494.

En las especies de *Neovagus* la vía de la insulina se induce al vitro con progesterona e insulina, aunque estos se unen a diferentes receptores, y ejercen su acción por vías distintas, la insulina lo hace activando una actividad de tirosina cinasa de la subunidad del receptor de insulina y la progesterona inhibe la adenil ciclasa, y baja los niveles de AMPc. Suena que p21 induce la maduración, sin disminuir el nivel de AMPc, se investiga su posible participación en la vía de la insulina, usando el anticuerpo 6B7, dirigido contra los aminoácidos 77-80 de p21, una región muy conservada en todas las p21 pero no en otras proteínas-G y que se involucra en la unión a GTP; el anticuerpo 6B7 detecta p21 de los genes H-, K- y N-ras. Se inyecta p21 viral en los oscitos, y estos maduraron pero con p21 inyectada junto con 6B7 se detecta una notable disminución en la maduración; 6B7 inhibió la maduración inducida con p21 en un 80% y aunque no inhibió la maduración inducida con progesterona, sí inhibió la inducida con insulina, dependiendo de la concentración de 6B7. In vitro, la tirosina-cinasa del receptor de insulina purificado fosforila p21, y posiblemente in vivo, p21 interactúa directa o indirectamente, con el receptor de insulina, utilizando dicha vía para inducir la maduración.

WEISSMAN, R. y AARONSEN, S. A. 1995. Members of src and ras oncogene families supplant the epidermal growth factor requirement of BALB/MK-2 keratinocytes and induce distinct alterations in their terminal differentiation program. Mol Cell Biol 15:3384-3396

La línea BALB/MK-2 de keratinocitos epidermales de ratón, requieren del factor de crecimiento epidermal (EGF) para proliferar y diferenciarse, en presencia de concentraciones mayores a 1.0 nM de Ca²⁺, presentando ciertos cambios fenotípicos, y la activación de genes específicos de células diferenciadas. Se estudiaron los efectos de los oncogenes virales de la familia src: v-abl, v-yes, y v-src que codifican proteínas-quinasa, también de v-onc, que son parte algunas secuencias con los primeros pero no codifica proteínas-quinasa y v-kinras y v-Ha-ras con distintas propiedades biológicas. Las células se infectaron con los respectivos virus oncogénicos y proliferaron en ausencia de EGF en especial las células infectadas con v-abl. En presencia del calcio las células infectadas con K-ras y v-onc siguieron creciendo, con muy relativa diferenciación, con v-src y v-yes se diferenciaron muy poco con concentraciones altas de calcio y con v-abl no hubo diferenciación. En las células infectadas con K-ras y v-onc se detectó la activación de un gene de células diferenciadas, pero no de otros genes. Se concluye que estos genes estimulan la proliferación e interfieren con la diferenciación mediante diferentes vías en la célula.

NAME: U. N. SERRA, R. G. DELA C. S. 1994. Deseño de una vía de expresión in vivo regulada de manera independiente y activada por oncogenos. Tesis de grado. UNAM, México, 1994.

Las oncogenes juegan un papel clave en la transformación maligna de las células. Los genes de la familia Myc, involucrados en la regulación de las interacciones celulares del sistema linfático, se encuentran en los virus de Epstein-Barr y en oncogenes celulares T-activos y afectan profundamente las células, con helix rodamientos formados por cadenas de α y β Id, y unig les tres diferentes clases de heterodímeros, los $\alpha\beta$, $\alpha\alpha$ y $\beta\beta$. La transcripción de los genes de las subclases HLA clase II, se regula por este mecanismo. Purios que se intentó investigar la respuesta de las células transformadas a los estímulos inmunológicos humanos, se emplearon células tumorales y células de la línea celular Raji, de linfoma de Burkitt, y se observaron células que no tienen la capacidad de expresar los subtipos HLA clase II, la $I\beta$ una variante de HLA DR β , y se usaron células de control, sin embargo, se logró restablecer la expresión de los genes DR, DP, y DG fusionando las células de línea de ratón con células de la línea H12.4.1 de sistema de ratón, a las transformadas con el $\alpha\beta$ de HLA, indicando la existencia de algún factor en el genoma de ratón, una respuesta para restablecer la expresión de los genes HLA clase II. Se transfectaron las células variantes DR β con los virus recombinantes, con los oncogenes v-src, y después de las células transfectoras, se observaron altas concentraciones de $\alpha\beta$ de los oncogenes y cambios de los genes DR, DP, así como un aumento poco perceptible del subtipo $\alpha\beta$ y una ausencia del DR de β visto que con HLA, que codifica la proteína-cinasa-C, también se inhibe la expresión de HLA clase II. Es posible que el mecanismo para inducir la expresión de estos genes, sea mediante alguna vía alternativa, en la cual se evita el paso en el que se encuentra la alteración, o bien mediante alguna otra vía metabólica que tal vez involucre a la proteína-cinasa-C. Esto indica un tipo respuesta de células malignas a estímulos inmunológicos humanos.

ALBANI, A., GARRA, J., GILBERTI, G., DE LUCA, G., MARTINI, G., DE
VILLERICH, A., MONTANO, N. E. 1974. "L'interazione reciproca tra
virus oncogeno e cellule tumorali e cellule HNF di una membrana cell
e di membrana". In: "Atti del Simposio", Roma, 1974, Quad. Sci. IRI-ENEA-4

La interacción al parecer surge a posteriori una vez cuando sólo
las en un fondo las alteraciones que las hacen ocupar del lugar,
sobreponiéndose a las alteraciones de la membrana celular. Estas
células actúan a ras de agua sobre la membrana basal y la invaden,
uniéndose a la laminina, lo que induce la producción de proteasa
que degrada la membrana basal, mientras otras células migran a
la migración de células cancerosas. La membrana basal tiene propiedades
que permiten a las células tumorales, pues las células
metastásicas exhiben afinidad con la laminina, que
las células malignas se metastatizan. En el otro la laminina induce
la actividad metastásica de las células malignas, lo que indica
que la membrana basal forma barreras entre las células tumorales
pero también influye en el comportamiento de las mismas. Las células
de la línea HNF7 de carcinoma mamario, invade la membrana
basal, migran in vitro, tienen receptores de estrógenos, e induc
en tumores en ratones en presencia de estrógenos, y al ser transp
lantadas con y sin virus, inducen tumores en ausencia de estrógenos.
Se estudian las interacciones entre células HNF7, y la membrana
basal y con la laminina, in vitro. Las células HNF7 tratadas con
estrógenos, formaron uniones más fuertes con la laminina y con la
membrana basal, tuvieron una mayor capacidad para migrar a través
de la laminina, mayor proliferación, en presencia de la matriz de
la membrana basal y mayor habilidad para invadir la barrera de la
membrana basal, que las HNF-7 sin estrógenos. Se transfectoron cé
lulas con el oncogene v-src en un plásmido, las cuales en ausencia
de estrógenos, presentaron el mismo comportamiento descrito,
aunque su capacidad invasiva en la membrana basal, y su capacidad
de unirse a laminina fueron más débiles. En ambos casos, se
detectó un número mayor de receptores de laminina, que en donde se
unen las células malignas. Se concluye que la actividad es regula
da en varias fases, y que la membrana basal es determinante en
algunas de las fases, tal vez donde intervienen los oncogenes ras,

TAFAGORUS, R. G., WILLIAMS, A. E., BURDEN, G., 1980, II, 17, STACEY, G. W., VASS, W. A. y LEWY, D. M. 1980. A transforming ras gene can provide an essential function ordinarily supplied by an endogenous ras gene. Mol Cell Biol 1:1040-1046.

El anticuerpo Y13-259 reconoce las proteínas ras tanto de tejidos como de virus e incluso de levadura. Al microinyectar los anticuerpos en células NIH-3T3 y en otros fibroblastos, las células en proliferación no pueden entrar en la fase S del ciclo celular, indicando que la proteína p21 celular debe cumplir normalmente una función esencial en el ciclo proliferativo celular, aunque los anticuerpos tal vez interfieren con otro proceso de la fase S. Para definir si la activación de ras implica la disminución e incremento de su función normal se microinyectaron proteínas p21 víricas oncogénicas en células detenidas en la fase G₁ mediante la acción del anticuerpo Y13-259, y las células entraron en fase S. Se concluye que las proteínas p21 oncogénicas, pueden reemplazar la función que normalmente cumple p21 normal en las células, que ha de ser muy importante en la proliferación y cuya alteración en las células, posiblemente sea determinante durante el proceso de transformación.

DURKIN, J. P., WHITFIELD, J. P. 1983. Characterization of p21 transit induced by the oncogenic oncogene viral P123 gene product. Mol Cell Biol 3:100-104.

Las proteínas oncogénicas ras tienen la capacidad de activar la maquinaria proliferativa celular al microinyectarlas en células detenidas en el ciclo celular. Al ocurrir dicha capacidad de p21 en relación con su oncogenicidad, pero para no microinyectar cada célula en cultivo, se trabajo con la línea celular H9c de células de fígado de rata infectadas con un virus de sistema de expresión su- bstante, sensible a la temperatura (tsSV1), que a 35°C ejerce su on- cogenicidad y las células infectadas se transforman, pero a 41°C, se inactiva y las células presentan un fenotipo normal. Las células transformadas reversion al fenotipo normal, al ser puestas de nuevo a la temperatura inactivante. Las células infectadas se pu- sieron en un medio de cultivo con nutrientes, detenidas entre las fases G₀-G₁ del ciclo celular, y a 41°C para inactivar p21 viral) a algunas células se les agregaron nutrientes en el medio de cul- tivo pero sin variar la temperatura, con lo que entraron a la fase G₁, mientras que a otras células solo se les disminuyó la tempera- tura, y estas se transformaron y entraron a la fase G₁ sin necesi- dad de agregar nutrientes. En ausencia de G₁, las células tam- bién se detuvieron en la fase G₀, con un presencia de nutrientes, y también entraron en la fase G₁ activando p21 viral. La activación de p21 en ausencia de nutrientes o G₁, no fue suficiente pa- ra que prosiguieran a la siguiente fase del ciclo celular, lo que indica que la función proliferativa de p21 posiblemente se ejerce en la fase G₀ e indica además, que p21 resulta tan eficiente como los nutrientes para inducir la fase G₁ del ciclo celular y que se requiere su continua presencia para mantener el fenotipo transien- tante de las células, no solo para inducirlo al inicio.

ANDREEFF, M., SLATER, D. E., BRESSLER, J., FURTH, N. E. 1986. Cellular ras oncogene expression and cell cycle markers by flow cytometry in hematopoietic cell lines. Blood 67:678-681

Las neoplasias de tipo hematopoyético representan un buen mo- delo para estudiar la actividad de los oncogenes celulares, puesto que se conocen bien los defectos en la proliferación y diferenciación de esta clase de células malignas. Mediante el uso de técni- cas de inmunofluorescencia se detectaron los niveles de p21 en cé- lulas de leucemia, buscando sus poblaciones de células con niveles aumentados de p21 para tratar de correlacionarlos con el ciclo ce- lular. Se estudiaron las líneas celulares H9c de precursores he- matopoyéticos de ratón, K561 de leucemia mieloblastica humana, y P1-2 de leucemia linfoblastica humana de células T, y en algunas se detectaron grandes cantidades de proteína p21, en otras menos, y en otras casi nada, pero no se detectaron diferencias signifi- cativas en células en distintas fases del ciclo celular. Se conciu- ye que la expresión de p21 no varía durante el ciclo celular.

RAJNER, E., ARNOLD, R. J., GOLDMAN, P. 1992. Glycolysis and methylaminoisobutyrate uptake in Rat-1 cells transfected with ras or myc oncogenes. Proc Natl Acad Sci USA. 89:3330-3335.

Entre las características bioenergéticas y metabólicas de células malignas, está el incremento de la glucólisis aeróbica y de la obtención de aminoácidos por acción de la vía del sistema-A, cuyo sustrato específico es el metilaminoisobutirato (MeAIB). Las células normales de riñón de rata, al ser expuestas al factor de crecimiento transformante tipo beta (TGF- β) muestran un incremento en ambos procesos y en las células transformadas, la metionina inhibe la glucólisis. Se estudió la relación entre estas diferencias y la acción de los oncogenes myc y ras, transfectando células de la línea RAT-1 con myc o con ras, y dejando otras sin transfectar. Con TGF- β se estimularon las células transfectadas con ras, las transfectadas con myc y las células control; en las transfectadas con ras, se observó un significativo aumento en el nivel de glucólisis, más que en las transfectadas con myc o en las células control y aun en las control estimuladas con TGF- β . En las células transfectadas que se expusieron al TGF- β , también se incrementó la glucólisis. La metionina ocasionó una inhibición en la obtención de aminoácidos. Estos resultados indican que probablemente, los oncogenes myc y ras participan en la regulación de los niveles energéticos en las células transformadas.

LAND, H., PARADA, L. F., WEINBERG, R. A. 1993. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature 304:596-602.

En estudios epidemiológicos se ha establecido que se requieren varios pasos para que ocurra un proceso maligno y sin embargo in vitro, pueden transformarse células al infectarlas con un solo virus como SV40 o polio, aunque estos virus tienen al menos dos oncogenes que actúan en combinación en la transformación; el feng tipo maligno entonces puede considerarse el resultado de al menos 2 eventos que pueden ocurrir al activarse 2 genes cuya función interactúe en forma cooperativa. La transformación de las células NIH-3T3 mediante la simple transfección de oncogenes ras activos, es una aparente contradicción a lo anterior, pero cabe señalar que estas células están inmortalizadas y posiblemente ya no conservan algunas propiedades de los fibroblastos originales. Se estudió la capacidad transformante de ras, transfectando el oncogene c-Ha-ras con mutación del codón 12 en fibroblastos primarios de ratón, que no se transformaron, ni al hacer varios pasajes celulares con los fibroblastos, ni al inyectarlos en ratones, se observó transformación. Se cotransfectaron los oncogenes v-myc y c-Ha-ras en fibroblastos primarios, los cuales se transformaron; en otros fibroblastos se cotransfectaron el antígeno-T de polio y myc, y en otros el antígeno-T de SV40 y myc, y también se transformaron, pero con v-myc solo, o con el antígeno-T y ras no hubo transformación. Se concluye que los oncogenes ras y myc ocasionan efectos que actúan en forma cooperativa en distintas fases del proceso transformante.

YANCOPOULOS, G. D., NISEN, P. D., TERNBYE, H., KOHN, N. S., GOLDFARB, R. H., ALT, F. W. 1985 N-myc can cooperate with ras to transform normal cells in culture. Proc Natl Acad Sci USA 82:3403-3407.

El oncogene N-myc presenta algunas similitudes con el oncogene c-myc; fue reportado por primera vez en muestras de neuroblastoma humano, donde se le ha encontrado activo con mayor frecuencia y también en retinoblastomas. La amplificación es un mecanismo de activación, lo que se ha demostrado insertándolo en plásmidos con promotores que lo expresan en gran cantidad, que al ser transfectados en células o en ratones inducen tumores. El oncogene c-myc en cooperación con los oncogenes ras, transforma células priarias al parecer mediante la participación de cada uno de ellos en distintas etapas de la tumorigénesis, y se investigó si N-myc tiene la misma capacidad. Los plásmidos con el oncogene c-Ha-ras ligando con mutación del codón 12, otros con el oncogene c-myc activo y otros con el oncogene N-myc unido a un promotor viral fuerte, se transfectaron en fibroblastos embrionales de ratón primarios, que no son una línea establecida, como las células NIH-3T3. Los fibroblastos transfectados con los 3 plásmidos, el de ras y el de c-myc se transformaron, al igual que los fibroblastos con los dos plásmidos, el de N-myc y el de ras; si embargo ni c-myc, ni N-myc ni c-ras por sí solos transformaron las células. Se concluye que N-myc también puede cooperar con ras para transformar células primarias, y que su oncogenicidad no se limita a células neuronales.

VELCICH, A., ZIFF, E. 1988. Adenovirus E1a ras cooperation activity is separate from its positive and negative transcription regulatory functions. *Mol Cell Biol* 8:2177-2182.

La región E1a del genoma de adenovirus es esencial para activar la expresión de la transcripción, en las primeras fases de la infección viral, además activa la transcripción de varios genes celulares, y reprime secuencias promotoras celulares y virales. Esta región codifica dos proteínas, de 237 y 243 aminoácidos, la de 287 aminoácidos activa la transcripción, y ambas tienen capacidad para reprimir promotores y participar en la inmortalización celular; cuando los adenovirus infectan células, las proteínas E1a se sitúan en el núcleo celular. El mecanismo transformante de adenovirus tal vez se relacione con la regulación de los genes involucrados en la proliferación celular como ras. Se estudiaron estos mecanismos comparando los efectos de adenovirus y de una variante de adenovirus que no reprime promotores fuertes, los dos en cooperación con ras. Este virus mutante fue transfectado junto con c-Ha-ras humano con mutación en el codón 12, en la línea REF52 de fibroblastos de ratón, en los cuales se indujo la transformación. Se concluye que la capacidad para reprimir los promotores fuertes no está asociada con la transformación inducida por adenovirus ni con la capacidad de cooperación entre la región E1a de adenovirus y los oncogenes ras.

SEGAWA, K., YANAGUCHI, N. 1987. Induction of c-Ha-ras transcription in rat cells by simian virus 40 large T antigen. *Mol Cell Biol* 7:556-559.

El antígeno-T del virus SV40 tiene una capacidad transformante que causa algunos cambios metabólicos y bioquímicos en las células que transforma, pero no se han determinado cuales de dichos cambios son directamente atribuibles al antígeno-T, y cuales son intrínsecos del proceso transformante como tal. Para determinar esto se construyó un plásmido con la secuencia del antígeno-T unida a un promotor regulable con dexametasona, se insertó el plásmido en células de rata, cultivadas con dexametasona, y se aislaron las que incorporaron al plásmido, que expresaron altas cantidades del ARNm del antígeno-T. Estas células se hibridaron con sondas de ARNm de 19 oncogenes, y sólo se detectó el ARNm de c-Ha-ras en mayor cantidad que en células control, los niveles del ARNm de ras fueron variables de acuerdo a la cantidad de dexametasona, en la misma proporción que los niveles de ARNm del antígeno-T. También la cantidad de p21 de las células transfectadas, fue mayor que en células control. Todo indica que la actividad transcripcional general en la célula aumentó por la inserción del antígeno-T que posiblemente participe en la regulación del promotor de c-Ha-ras.

WASYLYK, G., MILLER, J. L., PERCIVALLO, J., MACDONALD, B. 1987
The c-Ha-ras oncogene and a tumor promoter activate the polyoma
virus enhancer. Cell 48:523-534.

Los promotores fuertes ("enhancers") son secuencias que acti-
van la transcripción en eucariotes importantes para regular la ex-
presión de genes durante la diferenciación, así como la respuesta
de las células ante diversos estímulos. Con el fin de investigar
si los oncogenes celulares cumplen funciones que regulan la acti-
vidad de los promotores virales, se estudiaron los efectos del on-
cogene humano c-Ha-ras de el virus de polioma. En la línea celu-
lar MPC11B04 de mieloma de ratón se insertó un plásmido con el ge-
ne de globina y el promotor de polioma, el cual no aumentó la can-
tidad de globina celular, pero al insertar en este mismo plásmido
el oncogene humano c-Ha-ras con mutación del codón 12 la cantidad
de globina aumento de 20-50 veces. En fibroblastos L1TK de ratón
y en células NIH-3T3 se obtuvo la misma respuesta. El proto-onco-
gene c-Ha-ras expresado en grandes cantidades y el agente tumoral
IPV, también activaron al promotor de polioma, aunque en menor me-
dida. La activación e inactivación de promotores celulares indu-
cida por el oncogene ras, probablemente sea un mecanismo determi-
nante para que en las células ocurra un proceso de transformación.

NATLASHIMENSKI, D., SCHMIDTNER, J., SCHMIDT, L., KONEN, S., MURRAY, A., CRAWFORD, L. 1987. Human papillomavirus type 16 DNA cooperates with activated ras in transforming primary cells. *Subj 1 61241-6*.

Aproximadamente el 70% de las biopsias de lesiones cervicales reportadas tienen secuencias del virus de papiloma, principalmente del tipo 16, aunque los estudios epidemiológicos indican que otros factores pueden intervenir en el desarrollo tumoral, como los carcinógenos. El ADN del virus de papiloma (HPV), aumenta la capacidad tumorigénica de las células NIH 3T3, cuando son injertadas en ratones, pero sus efectos transformantes sobre las células en sí, son muy limitados. Para averiguar si HPV puede cooperar con ras, se transfirió su ADN en células primarias de fibro de rata (BRB), sin que se redujera su transformación, al respecto del plásmido con c-Ha-ras humano con mutación del codón 12, pero al transferirlos juntos las células sí se transformaron. Se hicieron diversas selecciones en el ADN del HPV para identificar la región involucrada en la cooperatividad, y se encontró que la región llamada E6/E7 de HPV al deletarse, se pierde la capacidad del virus de cooperar con ras; en esta región se codifican varios péptidos, y alguno de ellos posiblemente interactúa con ras para aumentar la oncogenicidad de ambos. Este es el primer reporte de cooperatividad entre los virus de papiloma y los oncogenos ras.

STACEY, D. W., WATSON, T., KUNG, H.-F., CURRAN, T. 1987. Microinjection of transforming ras protein induces c-fos expression. Mol Cell Biol 7:523-527.

El oncogene c-fos codifica una proteína de 62 Kd, localizada en el núcleo celular, y durante la estimulación mitótica celular, su expresión es uno de los primeros eventos. c-fos se expresa en muy bajos niveles, en la mayoría de los tipos celulares, pero al agregar factores de crecimiento o mitógenos a los fibroblastos, se observa una marcada, aunque transitoria inducción de su expresión. Se estudiaron las interacciones de los oncogenes ras y fos, en células NIH-3T3, detenidas en su ciclo celular por falta de nutrientes, en las que se microinyectaron proteínas p21 virales y humanas oncogénicas y se registró la proteína fos. Las NIH-3T3 normalmente se transforman a las 24 horas de la transfección con ras oncogénico, pero en las células estudiadas, 1 o 2 horas después de la microinyección empezó a acumularse proteína fos en el núcleo y esta acumulación aumentada persistió por 22 horas, un efecto similar al obtenido cuando se agregaron nutrientes en lugar de p21. Se inyectó el anticuerpo anti-p21 Y13-257 en células NIH-3T3 Swiss-3T3 y BALB-3T3, se les agregaron nutrientes y no se obtuvo la respuesta de c-fos. En células NIH-3T3 previamente transformadas con el oncogene ras, mantenidas sin nutrientes, los niveles de c-fos fueron parecidos a los de células normales, y al agregar nutrientes, se obtuvo la misma respuesta de c-fos, y la misma respuesta al anticuerpo. Se concluye que la participación de ras en la proliferación tal vez requiera que fos cumpla con alguna función transitoria, y que ambos oncogenes están relacionados funcionalmente en la transformación celular.

LEOF, E. B., PROFFER, J. A., ROSEN, H. L. 1987. Regulation of transforming growth factor type β action by activated ras and c-myc. Mol Cell Biol 7:2649-2652.

Los factores de crecimiento transformante (TCF), son proteínas con capacidad para inducir una proliferación sostenida e independiente de la fijación en agar suave, al menos en células mesenquimales cuya proliferación normalmente depende de su fijación en agar suave. Existen dos tipos de TGF: TGF- α , producido en diversas células transformadas así como en tejidos embrionales y de placenta, y TGF- β cuya localización es ubicua. Tiene capacidad para inhibir la proliferación de numerosos tipos celulares y de promover la proliferación independiente de la fijación de un gran número de células mesenquimales, en ausencia de TGF- α , y del factor de crecimiento epidérmico. En las células 10T1/2 de ratón, el TGF- β induce una respuesta muy limitada en agar suave, y se investigó si la intensidad de esta respuesta puede ser incrementada al combinarse con la acción de los oncogenes. Se transfirieron plásmidos con los genes c-Ha-ras, c-myc y ambos, en células 10T1/2, y en las células transfectadas con myc, no se registró un fenotipo transformante, con ras se transformaron y con ras/myc el porcentaje de células transformadas fue aun mayor. Se observó un ligero incremento en la proliferación independiente de fijación, al agregar TGF- β a las células transfectadas con ras y con ras/myc, pero en las transfectadas con myc, la tasa de proliferación aumentó 20 veces aprox. No se obtuvo respuesta con el factor de crecimiento epidérmico ni con interleuquina 1, insulina, FSH, ni con el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La respuesta observada con TGF- β fue similar a la respuesta de las células transformadas con oncogenes ras. Se concluye que las células 10T1/2 no tienen capacidad para producir proteínas c-myc, y que el TGF- β no ha de seguir las vías metabólicas que normalmente siguen los factores de crecimiento para inducir la proliferación independiente.

LEDF, E. B., PROPER, J. A., NOBES, H. L. 1987. Modulation of transforming growth factor type β action by activated ras and c-myc. Mol Cell Biol 7:2597-2602.

Los factores de crecimiento transformantes (TGF), son proteínas con capacidad para inducir una proliferación sostenida e independiente de la fijación en agar suave, al menos en células mesenquimales cuya proliferación normalmente depende de su fijación en agar suave. Existen dos tipos de TGF: TGF- α , producido en diversas células transformadas así como en tejidos embrionales y de placenta, y TGF- β cuya localización es ubicua, tiene capacidad para inhibir la proliferación de numerosos tipos celulares y de promover la proliferación independiente de la fijación de un gran número de células mesenquimales, en ausencia de TGF- α , y del factor de crecimiento epidermal. En las células 10T1/2 de ratón, el TGF- β induce una respuesta muy limitada en agar suave, y se investigó si la intensidad de esta respuesta puede ser incrementada al combinarse con la acción de los oncogenes. Se transfectaron plásmidos con los genes c-Ha-ras, c-myc y ambos, en células 10T1/2, y en las células transfectadas con myc, no se registró un fenotipo transformante, con ras se transformaron y con ras/myc el porcentaje de células transformadas fue aun mayor. Se observó un ligero incremento en la proliferación independiente de fijación, al agregar TGF β a las células transfectadas con ras y con ras/myc, pero en las transfectadas con myc, la tasa de proliferación aumentó 20 veces aprox. No se obtuvo respuesta con el factor de crecimiento epidermal ni con interleuquina 1, insulina, PMA, ni con el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La respuesta observada con TGF- β fue similar a la respuesta de las células transformadas con oncogenes ras. Se concluye que las células 10T1/2 no tienen capacidad para producir proteínas c-myc, y que el TGF- β no ha de seguir las vías metabólicas que normalmente siguen los factores de crecimiento para inducir la proliferación independiente.

SMITH, M. A., DeLuca, M., et al., y ROSE, M. A. 1984. Requirement for certain proteins during viral oncogene transformation. Nature 310:340-343.

Las oncogenes pueden agruparse en familias con bases en común teratícas comunes: los oncogenes de la familia ras, los que codifican proteínas similares como src, src y fos, los que codifican proteínas nucleares, como c-myc y c-mi, y los oncogenes de virus de ADN sin contrapartes celulares. Para estudiar las interacciones de distintos oncogenes, se transformaron células NIH-3T3 con ANI oncogénico y se les administró el anticuerpo Y13-259, que detecta las proteínas ras, y a las 12-18 horas de la infección las células transformadas con src, ras y fos, mostraron un nivel grado de reversión al fenotipo normal, el cual disminuyó por 50-50 horas, que es el tiempo que tarda el Y13-259 en desaparecer de las células, y luego regresan en el fenotipo transformado. Las células transformadas con src y raf se reversionaron y su proliferación prácticamente no cambió. En las células transformadas con virus de papiloma humano, al agregar Y13-259 la transformación celular revertió, pero en las células transformadas con el virus SV40, la presencia del anticuerpo Y13-259 no induce reversión. Esto sugiere que ciertas proteínas oncogénicas que actúan como factores de crecimiento, requieren la participación de proteínas las que probablemente transducen la señal del factor de crecimiento, que es recibida por el receptor con el que ras interactúa ras, a alguna molécula efectora citoplásmica involucrada en la proliferación, y posiblemente también en la transformación celular.

HOKENNA, W. G., HANAKAWA, H., HIRUMI, R. J. 1980 Site-specific integration of Herpes in transformed rat embryo cells. Science 211:1325-1328.

Algunas células transformadas con oncogenes presentan aberraciones cromosómicas, cuya implicación en el fenotipo transformante se investigó en los cariotipos de fibroblastos embrionarios de ratón transformados con *ras* y *myc*. Se establecieron 7 líneas celulares con los fibroblastos transformados, y en 4 de ellas se observaron alteraciones del brazo corto del cromosoma 3; en 2 de estas líneas, el cromosoma 3 estaba deletado en parte y en otras 2, parecía estar traslocado al cromosoma 12. En algunas células de esas 4 líneas y en otra línea más, se observaron trisomías del cromosoma 11 y cromosomas "dobles minutos". Se realizaron varios pasajes celulares, después de los cuales se encontraron de 2 a 5 copias del plásmido de *ras* y de 1 a 1000 copias del plásmido de *myc* en diversas células. El oncogeno *ras* transfectado se encontró inactivado en el cromosoma 3 de uno de los 2 cromosomas 3 y en las células con aberraciones del cromosoma 3, *ras* estaba en el cromosoma aberrante, en cambio no se detectó un sitio definido de integración de *myc*. La secuencia endógena de *ras*, probablemente activa como un mutágeno insertado que inactiva algún gene supresor de la tumorigenicidad desde su sitio específico de integración.

SACHIDANNE, G., FERDE, R. G., BRITTON, M. G. 1984. Metastatic potential of EPI mouse mammary adenocarcinoma cells is differentially induced by activated and normal forms of c-Ha-ras. *Oncogene* 1:149-155.

La progresión de un tumor a una metástasis puede ocurrir por el surgimiento y selección continua de células con mayor agresividad en una población de células tumorales, lo que lleva a la generación de una población de células cada vez más malignas y más raras. Para establecer la relación de ras con la metastasis se trabajó con la línea EPI de adenocarcinoma de mama, que es totalmente tumorigénica cuando se inyecta en forma celular en ratones, pero no es metastásica. Se transfirió c-Ha-ras humano conmutación del código II en células EPI, que se recombinaron en 25 ratones de los cuales, 10 desarrollaron metástasis de mama. Los niveles de ARNm de c-Ha-ras y de proteínas p21 oncogénicas, fueron variables en cada célula, sin que se correlacionaran estos niveles con la capacidad oncogénica. Se insertó un promotor viral fuerte junto al oncogene c-Ha-ras, sin que se observara diferencia en la incidencia de metástasis, pero el proto-oncogene c-Ha-ras humano junto al promotor viral no indujo metástasis, aun cuando se le detectó expresado en gran cantidad, lo que sugiere que H-ras activo induce una mayor agresividad de las células independientemente de su nivel de expresión, y que el gen normal carece de esta propiedad, aun en altos niveles. Se inyectaron tanto ratones carenciales de sistema inmune como ratones normales, y en ambos se observaron los mismos resultados, indicando que las células metastásicas pueden eludir las barreras inmunológicas. El que ras induce la capacidad metastásica puede indicar que las células ya tenían la maquinaria requerida para la metástasis, solo faltaba un paso en el que participa ras, por lo que es posible que la capacidad de inducir metástasis dependa más bien del tipo de células que afecte.

BOLSCHER, J. G. M., VAN DER SIJL, H. H. M., HERRFORD, J. J., HOLL, A., SMETS, L. A. y PLOEDR, H. L. 1992. Ras proto-oncogene induces N-linked carbohydrate modification: temporal relationship with induction of invasive potential. *Embo J* 11:3361-3366.

Los acidos sialicos son muy importantes en la determinacion de las propiedades membranales de las celulas eucariotas y en celulas malignas, la alteracion de sus propiedades de adhesion y su capacidad invasiva y metastasica es correlacionada con los cambios en la estructura de los acidos sialicos y carbohidratos de superficie, que presentan mas ramificaciones, y muchos de ellos tienen residuos de acidos sialicos terminales. Para investigar la relacion entre una proteina membranal como p21^{ras} con estos cambios, se transfectaron las celulas NIH-3T3 con los oncogenes *src*-*ras* y *src*-*ras*, y despues estas mismas celulas, se infectaron con el virus de estomatitis vesicular (VSV) cuya proteina-G se registro mediante marcaje radiactivo. En la proteina-G se usaba un alto grado de union a acidos sialicos. En celulas NIH-3T3 transfectadas con proto-oncogenes *src*-*ras* y *src*-*ras* unidos a promotores virales regulables con dexametasona (DT) en presencia de DT la proteina-G agrego los mismos cambios. Las celulas activadas con DT, penetraron y destruyeron un corazon de pollo, las celulas sin DT no lo invadieron, pero al agregar DT en el momento de ponerlas a los 2 dias se volvian invasivas. El cambio en la proteina-G, se detecto aun en las NIH-3T3 transfectadas que no se transformaron. En las celulas transfectadas se detecto un mayor peso molecular en el resto de los carbohidratos de membrana distintos de la proteina-G en relacion con las celulas normales, indicando que en los cambios de carbohidratos ocurrieron cambios similares a los de las proteinas-G. Los cambios en los carbohidratos ocurrieron al mismo tiempo que en las celulas se detecto la presencia de p21, por lo que se concluye que la alteracion en los carbohidratos membranales, es uno de los primeros eventos en el proceso de transformacion y que los oncogenes *ras* probablemente participan en los cambios superficiales caracteristicos de las celulas malignas y metastasicas.

ENDIMMAN-RAMOS, et al., *CELLULAR GENE EXPRESSION IN A MOUSE LYMPHOMA CELL LINE*. CARLOS GARCIA-RODRIGUEZ.

En linfomas, leucemias y en fibrosas mesodermicas, las glucocorticoides inducen a las células a que detengan su ciclo celular en la fase G₀, y eventualmente las llevan a muerte. Los glucocorticoides causan en las células un decremento en la incorporación de glucosa y en la síntesis de ARN así como la fragmentación del ADN entre otros efectos; sin embargo, no se ha logrado determinar cuáles de estos efectos son causados directamente por los glucocorticoides y cuáles son producto del proceso de muerte celular en sí, pero se sabe que los glucocorticoides inducen la transcripción de la alfa-1 globulina, alpha₂u, y prealbumina en ciertos tejidos. Se investigó la participación de los endogenos humanos c-myc, c-myb, y c-Mi-1 en la regulación de la proliferación celular. Los glucocorticoides causan la muerte de las células S49 de linfoma de ratón, por lo que a estas células se les dió un tratamiento con acetato de triacetonolona (TA), que es un análogo de glucocorticoides, y se observó la prolongación del tiempo de división celular, que normalmente es de 15-17 horas, a 24 horas. 3 horas después de iniciado el tratamiento, se detectó la disminución en los niveles del ARN de c-myc, c-myb y c-Mi-1 en el ARN de este tipo se registró la disminución más acentuada, y estos niveles continuaron disminuyendo durante las siguientes 7-11 horas. No disminuyó el ARN de otros genes indicando que la maquinaria transcripcional de las células S49 seguía funcionando. Se concluyó que el decremento observado en la expresión de los 3 oncogenes puede deberse a que los 3 actúan de manera simultánea y coordinada en la inducción de la proliferación celular de las células malignas.

INHERENCIA, A. G. 1978. *Manejo genético de la oncofisiología*. (en prensa). (1978-1979).

Las aplicaciones genéticas del cáncer suponen la existencia de 9 grados mayores de complejidad genética: (a) las mutaciones espontáneas, (b) las alteraciones hereditarias que inducen mutaciones, (c) las anomalías genéticas que confieren cierta debilidad a las mutaciones, y (d) la existencia de ciertos tipos de cáncer. Se calcula que un 50% de las neoplasias humanas pertenecen al primer grupo, el cual posibilitará que cuando se prevenga, los tipos de cáncer de los otros 4 grupos alcancen un mayor número de sujetos que en el primer grupo, que por sí sola, pueden aumentarse como en el segundo grupo que al parecer agota la mayoría de los casos de cáncer, y su frecuencia va disminuyendo. En el tercer grupo, lo que se hereda es la predisposición al cáncer, y en el cuarto, se hereda el cáncer en sí propiamente de un cierto tipo. Estos últimos dos nos han revelado la existencia de un cierto tipo de genes, los genes antioncogénicos, derivados de los oncogénicos, en que los oncogénicos son dominantes, y en los antioncogénicos, el gene responsable de la malignidad es recesivo, y su alelo normal, que es el antioncogénico inhibe la expresión de su oncogénico. Los antioncogénicos se detectaron inicialmente en pacientes con retinoblastoma, que se detecta con años de anticipación, y el porcentaje de supervivencia es muy alto lo que ha permitido estudiar la descendencia de los sobrevivientes que en ciertos casos desarrollaron retinoblastoma y la incidencia de casos se registró, encontrándose un patrón de segregación que indica la existencia de un gene recesivo. En los individuos heterocigotos, con el alelo normal y el maligno, la descendencia puede presentar los 4 alelos normales y no desarrollar el tumor, o los 2 alelos malignos y no ser un individuo viable, o bien puede ser heterocigoto, en cuyo caso el alelo normal inhibirá al recesivo a menos que en el alelo normal ocurra una mutación, inactivación, etc. y en ese caso se desarrollará el tumor. El gene de retinoblastoma se localizó en el cromosoma 13. También se han detectado antioncogénicos en el tumor de Wilm's, pero aún no han habido suficientes casos para un seguimiento generacional. Es difícil hacer registros genéticos humanos lo suficientemente exhaustivos para determinar cómo es que los antioncogénicos suprimen la oncogenicidad, pero con registros de esta naturaleza podrán establecerse los mecanismos que permiten a las células combatir la malignidad.

PERAZZOLI, G. M., LAMM, G., and G. J. FODDIE, JR., *Antibody-Dependent Transformation of Rat 3Y1 Fibroblasts by an Oncogenetically Active Cell Transformation by Antisera Specific for Soluble Cell Surface Proteins*. *Radiat. Environ. Biophys.* 1981.

La mayoría de las proteínas -de próter y oncogénicas, se liberan en una reacción del estado II, por lo que para distinguir las y estudiar sus funciones, se analizó el efecto de un anticuerpo dirigido contra un péptido con la secuencia de una región del extremo amino de p21, con serina en el codón 11, que corresponde a la secuencia de un oncogene ras activo. Se observó que este anticuerpo bloquea la autoconversión y la unión a 5S de p21 del oncogene viral v-src, lo que indica que estas actividades están en la región del codón 11 reconocida por el anticuerpo. Se transformaron células de riñón de rata con el oncogene v-src, y a las 48 horas se observó que las células transformadas revirtieron al fenotipo normal y el efecto de reversión persistió por 48 horas, punto luego de 48 horas las células nuevamente regresaron al fenotipo transformado. Se estudió el anticuerpo in vivo y se observó que este anticuerpo no reconoce a las proteínas p21 proto-oncogénica, ni a la proteína viral p21 del oncogene v-src. Se concluye que la afinidad por nucleótidos de guanina es muy importante para que ras cumpla con su función transformante, y que los anticuerpos que detectan p21 oncogénica, pero no p21 proto-oncogénica, logran bloquear la acción transformante de los oncogenes ras en las células.

DAMIAN O. FERNANDEZ, M. D., PH.D., and J. H. COOPER, JR. The effects of induced reversion of retransformed cells: Reversion of transformation by specific antigens and its reversal by 5-azacytidine. *Cell* 1981 27:105-110.

El interferón inhibe el desarrollo tumoral in vivo, por ello se investigó su efecto en la supresión de los oncogenes ras. Las células NIH-3T3 transformadas con el proto-oncogene c-Ha-ras unido a un promotor viral fuerte, se sometieron a un tratamiento prolongado con interferón y revertieron a su fenotipo normal, y al retirarse el interferón siguieron manifestando tumores, aunque expresando gran cantidad de p53. Estas células células pertenecientes, se transformaron con células con mutación del codón 12, y se transformaron, pero en menor proporción que las NIH-3T3 control, transformadas al transfectarse el oncogene ras. Las células NIH-3T3 tratadas con interferón, fueron transfectadas con los oncogenes virales v-Ha-ras, v-Src, v-abl y v-src, y también el sitio en la retrotranscripción sin empuje con v-mos, se retrotransformaron. La metilación del ADN es un mecanismo de regulación genética, por lo que se trató a las células con agentes inhibidores de enzimas encargadas de la metilación del ADN, como la 5-azacytidina, y se observa una notable retrotransformación de las células que habían revertido con el interferón, las cuales incluso desarrollaron tumores al ser inyectadas en ratones; por el contrario, las NIH-3T3 control no se transformaron con la 5-azacytidina. Las células retrotransformadas de nuevo revertieron al fenotipo normal al ser tratadas con interferón, lo que indica que el interferón actúa a nivel de la metilación del ADN, y puesto que no se da tanto que ocurriera metilación en el oncogene c-Ha-ras transfectado ni en el promotor viral unido, se concluye que ras interviene en la regulación de otros genes y que la metilación del ADN, como mecanismo de regulación genética, causa ciertos efectos que probablemente se superponen con los efectos de los oncogenes ras.

SHIBATA, M., IYAN, J., NISHI, T. NUCLEIC ACID. 1979. Partial Overlap of the Promoter Phosphorylation Sites Transcribed In Vivo in Cells by Transfer of a Human Gene. Proc Natl Acad Sci USA 76:20-24

Se ha propuesto la del locus de genes supresores de los genes transformables o oncogénicos, cuya inactivación por delección o rearrange, etc. puede hacer efectivos supresores para la acción de oncogenes dominantes. Se estableció un sistema para intentar identificar y caracterizar los genes supresores transfiriendo células COS de rata, con el oncogene c-Ha-ras insertado con rotaciones del código 12, y se les transfirió ADN de placenta humana. Algunas de estas células mostraron un fenotipo parcialmente reconstituido, y al injectar las en ratones indujeron el desarrollo tumoral muy limitado, a diferencia de las células transformadas con el oncogen humano que inducen tumores con un 100% de eficiencia. Las revertantes se analizaron para localizar secuencias de origen humano, y se detectó un fragmento de 18000 bases de bases, que parece incluir la secuencia responsable de suprimir la oncogenicidad de ras, aunque no suprimió la oncogenicidad de ras al transfectorse aislado en las células transformadas. Esta gene cubre probablemente varias o todas las distancias en la serie de eventos bioquímicos desencadenados por la acción del oncogene ras, pero es todo-gene, es muy importante identificar las secuencias que codifican inhibidores específicos de la acción de los oncogenes ras, pues estos seguramente le proporcionarían valores claves para lograr determinar los mecanismos por los cuales los oncogenes ras inducen la transformación.

BEITZ, S. H., MINKING, H. A., BRILL, G. 1968. Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells. Proc Natl Acad Sci 65:3587-3590.

La carcinogénesis es un fenómeno complejo que se lleva a cabo en varios pasos, y que cuando se nos con 2, el establecimiento y la promoción de la transformación. Para analizar estos pasos, se transformaron keratinocitos primarios de epitelio de ratón con el virus de sarcoma de Harvey, y después se injertaron en la piel de ratones, mediante una técnica que permite que el injerto quede recubierto de una membrana especial, de tal manera que no sea cubierto por la piel del ratón, y se observó el desarrollo de tumores in vivo incompletos epiteliales en todos los ratones en 10-14 días. Se mezclaron in vitro los keratinocitos transformados con fibroblastos normales, las células mezcladas se injertaron en la piel de 25 ratones, y solo en 23 de ellos se desarrollaron pequeños tumores, en un tiempo mayor que en el ensayo anterior. Con keratinocitos normales de ratón no se obtuvo la misma respuesta ni una otra tipo celular. Se concluye que en las células normales, existen elementos que bajo ciertas condiciones, contrarrestan el desarrollo de tumores, y falta aún identificarlos y caracterizarlos.

OSHMERS, H., KUI, H., DIMON, H., SUDANWANI, T., LIND, P. H.,
BARRETT, J. C. 1982. Role of the oncogene c-myc in neoplasia
induced by the Hamster tumor. Cancer Res. 42: 1111-1114.

En las células designadas con ese nombre las observaciones org
mórficas, pero se demostró que significan específico pueden te
ner, y para investigar, se transfirieron las células de cubierta
de hamster Siria (SHS) con los oncogenes v-Ha-ras y v-myc; dichas
células inductor tumoral en ratones y en ellas se detectó la pér
dida del cromosoma 15. Estas células se fusionaron con las célu
las EHE originadas, y en las células híbridas se observó un fenoti
po no transformado, además de que mostraron envejecimiento celular
y no comenzaron tumores en ratones, pero después de sucesivos pasaje
s celulares, las células híbridas adquirieron un fenotipo cada
vez más transformado y en lugar del envejecimiento, desarrollaron
inmortalidad. Las células híbridas de los primeros pasajes presen
taron gran cantidad de p21 viral y de ARNs de v-Ha-ras y de v-myc,
y estos niveles se mantuvieron constantes en las células que reco
braron su malignidad. Se observó la pérdida del cromosoma 15 en
un porcentaje significativo de células híbridas, lo que indica que
esta carencia radica en la pérdida de algún gene celular, que su
prime el cambio necesario para el desarrollo neoplásico, así como
para el envejecimiento celular. Se concluye que las células hí
bridas tumorigénicas presentan ciertas ventajas sobre las células
híbridas normales permitiéndoles expandirse en los cultivos, y que
el envejecimiento celular posiblemente sea un mecanismo de supres
ión tumoral, en cuyo caso la inmortalidad sería un carácter reces
ivo. El hecho de que tanto más como ras se siguieran expresando
en células híbridas no tumorigénicas, igual que en las tumorales,
indica que el posible elemento supresor no actúa ni a nivel trans
cripcional ni traduccional, sino que probablemente interactúa con,
regula, o compite con p21 en un determinado punto de la cadena de
eventos transformantes. Se propone el término de genes supresores
tumoral por ser una descripción funcional, en lugar del término
anticarcinogénico que supone un mecanismo específico de supresión, el
cual generalmente no está bien determinado.

POWER, M., MICHAELIS, S., FOLTZ, M., BROWN AMINO, G., FIELD, G.,
HERSKOWITZ, I., WIGLER, M. 1984. RAM, a ras gene of yeast
required for a functional activation of Ras proteins and for
production of mating pheromone in yeast. Cell 40:413-422.

En las células las proteínas de la membrana generalmente son transportadas a través del retículo endoplásmico, hasta situarse en su posición final. Entre las excepciones están los genes Ras, que se transportan por el citoplasma hasta la membrana, fijándose mediante un ácido palmitico. Una proteína que al parecer, después de de la unión lipídica para unirse a la membrana es el factor-a, la feromona de apareamiento, que solo producen células haploides aparentes tipo a de *S. cerevisiae*; el factor-a tiene en su extremo carboxilo la misma secuencia de las proteínas ras de mamífero. Se estudiaron células de *S. cerevisiae* con la proteína RAS2-val-19 con la mutación equivalente a la que activa ras en mamíferos y al someterlas a un chequeo léxico que normalmente resisten levaduras normales, solo sobrevivieron muy pocas células y de las sobrevivientes, algunas mostraron una división dependiente de la temperatura. Se localizaron estas células y en ellas se detectó un elemento supresor del gene RAS2-val-19, que se llamó supH. La supresión ejercida por la proteína supH, no se registró al nivel de 15 adenil ciclasa, que no presentó cambios en las células con respecto a las normales; en las mutantes también se observaron deficiencias del factor-a, y su fenotipo resultó ser similar al de las levaduras con mutación del gene STE12, que se requiere para la biosíntesis del factor-a. Se clonó el gene supH, y se investigó su relación con el factor-a y con Ras, determinándose que supH participa en la unión de ambas proteínas con el lípido, que es lo que determina su unión membranal. Se renombró el gene supH-STE12 como RAM, por ras y factor de acoplamiento ("mating-a factor") y se concluye que este gene posiblemente interviene en otros procesos celulares; algún homólogo del gene RAM puede existir en mamíferos, el cual suprimiría la acción de ras, incluyendo su oncogenicidad.

RAS EN CARCINOGENESIS ANIMAL

Los oncogenes ras se han estudiado ampliamente en modelos de carcinogenesis en animales, investigando tanto los agentes que activan los oncogenes ras, como los efectos de las proteínas oncogénicas ras en los organismos animales para tratar de extrapolarlos al caso del organismo humano donde no pueden llevarse a cabo experimentos de inducción de tumores, como en animales. La carcinogenesis es un proceso de múltiples pasos y las alteraciones observadas *in vitro* se pueden o no presentar dentro de un organismo, dependiendo de condiciones tales como barreras inmunológicas, integración con células normales, irrigación sanguínea adecuada, etc., que no se presentan *in vitro*, por ello también es importante estudiar la acción de los oncogenes ras *in vivo*. Además en experimentos en animales, se han obtenido resultados que respaldan la teoría de que la activación de los genes ras es un evento inicial involucrado en el desencadenamiento del proceso transformante, y no es una consecuencia del mismo.

Los modelos de experimentación más empleados son los murinos (ratas, ratones y hamsters) donde se ha obtenido importante información principalmente respecto a la carcinogenesis química, analizando los tipos de neoplasias inducidas con diversos carcinógenos químicos, como el metilcolantreno (Eve y Aaronson, 1983), que fue de los primeros experimentos reproducibles de la activación oncogénica de ras con carcinógenos químicos. Se ha observado una correlación entre ciertos carcinógenos, y el tipo o localización de la neoplasia inducida, como con la metil(metoximetil)nitrosamina (DMN-DMN), que induce preferencialmente tumores renales en ratas (Sukumar y cols., 1986); el N-hidroxy-2-acetylaminofluoreno, el vinil carbamato y el 1'-hidroxy-2',3'-dehidroestragol inducen tumores hepáticos (Wiseman y cols., 1986). La mayoría de los carcinógenos químicos, al ser metabolizados, generan residuos que inician la carcinogenesis al interactuar con el ADN celular, interacciones que suelen ser muy específicas como con beta-proioleotona que induce el cambio de A a T, en el segundo nucleótido del codón 61 del gen c-Ha-ras de mamíferos (Hochwalt y cols., 1988), y con 12-O-tetradecanilforbol-13-acetato, que induce tumores epidermales benignos (papilomas) que en ciertos casos se desarrollan como tumores malignos de la piel (Strickland y cols., 1988). Entre los carcinógenos químicos existen unos 12 hidrocarburos aromáticos, que presentan determinadas regiones directamente involucradas con la carcinogenesis, las cuales inciden sobre el ADN, en la secuencia de los genes ras y los activan (Blizub y cols., 1986).

Este tipo de inducciones ha proporcionado interesantes resultados: El N-nitroso-N-metilurea (NMU) induce linfomas de timo en ratones que presentan la pérdida de uno de los alelos, lo que está relacionado con el concepto de antioncogenes (Guerrero y cols., 1985). El NMU tiene actividad metilante, y al parecer interactúa con sitios específicos del ADN como el codón 12 de c-Ha-ras-1 que por alguna razón no son sitios que puedan reparar eficientemente los mecanismos celulares de reparación. Otros resultados se han obtenido con el 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA) con el que se

inducen tumores epiteliales, que pueden ser benignos, o susceptibles de reversión, lo que sugiere que la acción de los oncogenes ras no resulta ser suficiente para mantener el fenotipo neoplásico (Leon y cols., 1986). El DMBA actúa sobre los residuos de adenina y guanina, e induce mutaciones puntuales en los genes ras.

En los modelos animales también se ha estudiado la cooperatividad entre los oncogenes, principalmente entre los oncogenes *myc* y *ras*, tanto en ratones (Sinn y cols., 1987) como en hamsters, en donde también ha habido pérdida de un cromosoma (Oshimura y cols., 1988).

En animales también se inducen desarrollos tumorales con los agentes virales como los virus de sarcoma murino de Harvey que inducen papilomas en la piel de ratones que pueden o no convertirse en tumores (Roop y cols., 1986), así como con los virus de Harvey y de BALB, que también inducen tumores epidermicos (Brown y cols., 1986).

En organismos vivos, *ras* interviene en desarrollos metastásicos al participar en las características que convierten las células malignas en metastásicas. Asimismo se ha detectado su expresión en ciertas etapas del desarrollo hepático donde posiblemente participa pues *ras* interviene en la transformación maligna de las células hepáticas (Yaswen y cols., 1985).

Los oncogenes *ras* han permitido incluso estudiar los procesos carcinogénicos desde otras perspectivas, pues se han inducido tumores con *N*-nitrosometilurea (NMU) y con radiaciones en ratones en donde se han detectado activaciones conjuntas de los oncogenes *K-* y *H-ras*, indicando que la cooperatividad no solo existe entre *ras* y otros oncogenes, sino también entre los distintos genes *ras* (Diamond y cols., 1988).

RYN, A., SAKIMURA, A. A. 1984. Frequency of activation of c-Ha-ras oncogene in fibrosarcoma induced by methyl(methoxymethyl)nitrosamine. *Cancer* 53:922-924.

En las células NIH-3T3 transformadas con el carcinógeno químico metil(metoximetil)nitrosamina (MMN-OMN) se ha demostrado que al digerir el ADN celular con enzimas de restricción, se obtienen fragmentos que no se obtienen al digerir el ADN normal de estas células. Para estudiar el efecto de la MMN in vivo, se indujeron fibrosarcomas en ratones con MMN, a los cuales se les extrajo el ADN que se transfirió en células NIH-3T3 que se transformaron. Se analizó el ADN de las NIH-3T3 transformadas, con una sonda derivada de la secuencia transformante del virus de herpes simple de Kirsten, y se identificó un fragmento homólogo en las células transformadas, lo que es importante pues en todo este proceso no hubo ningún tipo de intervención viral. Se extrajo el ADN de las células transformadas para transformar otras NIH-3T3, y en las nuevas células transformadas, se identificó el mismo fragmento homólogo al oncogénico viral. Se concluye que en las células NIH-3T3 homólogas de los oncogenes virales, que intervienen en procesos de transformación celular.

SUKUMAR, S., PERANTONI, A., REED, C., RICE, J. M., WENIG, M. L. 1986. Activated K-ras and H-ras oncogenes in primary renal mesenchymal tumors induced in F344 rat by methyl(methoxymethyl)nitrosamine. *Mol Cell Biol* 6:2718-2720.

La metil(metoximetil)nitrosamina (MMN-OMN) es un agente anti-lante tumorigénico. En ratas F344 (32 machos y 12 hembras) se inyectó una sola dosis peritoneal a las 48 horas de nacidos y aparecieron tumores renales en 22 de las 54 ratas sobrevivientes. La mayoría de los tumores fueron de origen mesenquimático, se presentaron en ratas de ambos sexos, tuvieron un rápido crecimiento, fueron agresivos e invadieron el parénquima renal adyacente, algunos presentaron células con diferenciación micloblastica. No se observaron metástasis a otros órganos aunque se detectaron ocasionales crecimientos en otros sitios, pero en hígado se detectaron con frecuencia precursores de neoplasia hepática. El ADN de 25 ratas con tumores se transfirió en células NIH-3T3, y 11 de dichas muestras tumorales transformó las NIH-3T3, el ADN de las 11 muestras se hibridó con sondas de oncogenes ras, en 10 de ellas se detectó el oncogén c-Hi-ras alterado y en la mayoría de estos 10, también resultó estar amplificado c-Hi-ras, de 3 a 10 veces en las NIH-3T3. La muestra que no hibridó con K-ras hibridó con la sonda del oncogén N-ras. Se transfirieron células NIH-3T3 con ADN de células circundantes, que no indujeron transformación, con lo que se concluye que la activación de los oncogenes ras, debida a la acción del carcinógeno MMN-OMN, fue la responsable de la tumorigénesis.

WILLIAMS, R. W., BRIDGES, R. W., MILLER, J. J., SCHWARTZ, M. D., MILLER, S. M. 1976. Activating mutations of the c-Ha-ras proto-oncogene in chemically induced hepatomas of the rat (R6C F1) mouse. Proc Natl Acad Sci USA 73:5925-5929.

La interacción entre carcinógenos químicos y el ADN de tejidos blancos es esencial en el proceso carcinogénico, pues las lesiones en el ADN pueden originar mutaciones en sitios críticos, como las proto-oncogenes. Se estudió esta interacción, en ratas macho R6C F1 de 12 días de edad a las que se administraron dosis únicas de 2 carcinógenos químicos, con diferentes estructuras que reaccionan con distintos sitios del ADN: N-Nitrosodimetilnitrosamino (N-NO-DMN), 1'-hidroxyl-2'-E-dimetilacetilamino (HO-DMN), y el vinil carbamato (VC), y a los 7 meses las ratas desarrollaron hepatomas a los que se extrajo el ADN para transfectar células NIH-3T3 y se transformaron las células con el ADN de tumores inducidos con los 3 carcinógenos. En el ADN de todas las muestras tumorales, se detectó alteración de c-Ha-ras, y una muestra se detectó alterado c-Ki-ras, la mayoría de los oncogenes c-Ha-ras alterados presentó mutación en la segunda posición del codón 61, en 57 - 76. Se concluye que esta mutación no pudo ser espontánea, pues difícilmente ocurriría en la misma posición del mismo codón del mismo gen, y que la activación de oncogenes puede darse por uno de los primeros eventos durante el proceso carcinogénico en hepatomas, más que uno de las consecuencias de la transformación.

HOCHWALT, A. K., SOLOMON, J. J., GURIN, S. J. 1978. Mechanism of H-ras oncogene activation in adult murine carcinoma induced by an alkylating agent. Can Res 38:554-558.

La beta-propiolactona (BPL) es un carcinógeno bien caracterizado que origina tumores en el sitio de exposición en ratones, en los que se han reportado alteraciones genéticas tales como mutaciones de bases y aberraciones cromosómicas. Se expusieron ratones a la acción del BPL, en los cuales se observó el desarrollo de carcinomas epiteliales y fibrosarcomas. Se obtuvo el ADN de uno de los carcinomas inducidos con BPL, que se transfirió en células NIH-3T3 y las células se transformaron; se analizó este ADN con diversas sondas, y sólo se detectó alterado el gene c-Ha-ras, que presentó una mutación en el segundo nucleótido del codón 61. No se encontraron otras alteraciones en ningún otro oncogene, por lo que se concluye que el segundo nucleótido del codón 61 del gene c-Ha-ras, es el sitio de acción del BPL.

STRICKLAND, J. E., GREENHALL, D. C., MONTAGNA-CASTA, A., KATZMANN, H., RESTREPO, C., GALASCHOK, R. y YUSPA, S. H. 1978. Development of murine epidermal cell lines which contain an activated ras-Ha oncogene and form papillomas in skin grafts to syngeneic nude mice hosts. *Can Res* 38:168-172.

Cuando se injeraron tumores epiteliales con carcinogénesis química, lo primero que se detectó ocurrió por la aparición de tumores benignos epiteliales, llamados papilomas, y un pequeño porcentaje de estos papilomas se convirtió después en carcinomas; la conversión puede estimarse con métodos químicos. En células epiteliales con oncogenes ras activos, se estudió la relación entre el fenotipo de papilomas con un ras-Ha genético específico y los ras bios genéticos asociados al desarrollo de tumores benignos en ratones. Las líneas fueron la 303, de epitelio de rata 303B inducido con 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno (DMBA); la SP-1, de papilomas de ratones bebras, inducidos con el DMBA, y provistos con el 12-O-tetradecanilforbol-13-acetato (TPA); la SP-4, igual a la anterior pero con dosis 5 veces mayores de DMBA y TPA, y la LC14 de células epiteliales de ratones 303B transformadas espontáneamente. Estas células se injertaron en el epitelio de ratones macho 303B de 2 semanas de edad portales de sistema inmune y todas indujeron papilomas epidérmicos con células diferenciadas, y no se detectaron tumores malignos. Todas las líneas transformaron las células NIH-3T3, indicando que tenían oncogenes ras activos y al analizar su ADN, en las 4 se detectó la mutación del codón 61 del 5-Ha-ras. Todas fueron capaces de sobrevivir en concentraciones de Ca²⁺ que impiden sobrevivir a las células normales. Se concluye que la activación de oncogenes ras es un primer evento en la promoción tumoral, pero dada la ausencia de tumores malignos la activación de ras parece no ser suficiente para inducir los pasos subsiguientes que constituyen el proceso tumorigénico.

BRUB, D., MADD, H. W. y ORSHAN, H. M. 1981. Mutagenesis of the N-ras oncogene in mouse skin tumors induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. Proc Natl Acad Sci USA 78:6848-6852.

Se ignoran los mecanismos por los que los hidrocarburos policíclicos aromáticos inducen la transformación celular, y para investigar, se indujeron tumores epiteliales en ratones dadas las ventajas de que el tejido es más accesible que el de los tumores internos y se pueden ir registrando las fases del desarrollo tumoral. Se aplicó 7,12-dimetilbenzo[*a*]fluoraceno (DMBA) en los ratones CD-1 2 veces por semana por 15 semanas; en otros se aplicó una dosis de dibenz[*a,h*]acridina (DB[*a,h*]ACR) y en otros más una dosis de benzo[*a*]pireno (B[*a*]AP), y después de 10 días, en estos últimos 2 grupos se aplicó 12-miristato 13-acetato 2 veces por semana por 28-29 semanas. El ADN de los carcinomas inducidos se transfirió en células NIH-3T3, que se transformaron con las muestras de DMBA y DB[*a,h*]ACR, pero no con las de B[*a*]AP. En el ADN de los tumores que transformaron las NIH-3T3, se detectó una mutación en el *c-myc* gene c-Ha-ras de A - T, en el codón 61. No se detectó alteración en N-ras ni en c-Ki-ras. Los papilomas benignos inducidos con el DB[*a,h*]ACR también transformaron las NIH-3T3 y presentaron la misma mutación en el codón 61 del gene c-Ha-ras, indicando que la mutación es uno de los primeros eventos en la carcinogénesis. Ambas técnicas de inducción tumoral originaron la misma mutación en el codón 61 de c-Ha-ras, por lo que se concluye que este es un sitio crítico de interacción de c-Ha-ras con los hidrocarburos.

GUERRERO, I., VILLASANTE, A., CORDES, J. y FELLICER, A. 1985. Loss of normal N-ras allele in a mouse thymic lymphoma induced by a chemical carcinogen. Proc Natl Acad Sci USA 82:7810-7814.

El carcinógeno N-nitroso-N-metilurea (NMU), induce linfomas de timo en los que frecuentemente se encuentra activado el oncogene N-ras. Se inyectaron ratones jóvenes con NMU para analizar al N-ras, que está formado por 4 exones, 567 codones, y codifica una proteína de 21 kD, p21. Al comparar la secuencia del gene N-ras de ratón con el correspondiente N-ras humano, se detectaron 51 bases diferentes entre ambos, de los cuales solo se expresan 5 cambios a nivel de la proteína. Todos los cambios fueron en el exón 4, la región más variable entre los diferentes genes ras, y se encontró que la diferencia entre la proteína normal y la de células del linfoma inducido con NMU, es una mutación en el codón 61. En células tumorales no se encontró el alelo normal de N-ras, lo que tal vez se debe a que las células tumorales han perdido el alelo normal, o que ambos alelos presentan la mutación. Esto es importante, pues se considera que los genes *ras* mutados son dominantes. A los 4 meses de que se les inyectó el carcinógeno a los ratones, se analizaron las células de los tumores inducidos y en todas las células se presentó la misma alteración, por lo cual, se concluye que la activación de N-ras es uno de los primeros eventos del proceso tumorigénico, que origina toda una población de células con las mismas características.

LEON, J., KANINO, H., STEINBERG, J. S. y PELLICANI, A. 1989.
N-ras activation in benign and self-regressing skin tumors
(keratoacanthomas) in both humans and an animal model system.
Mol Cell Biol 8:756-759

Existen dudas en cuanto a la activación de oncogenes ras, si origina la tumorigenesis o si es una consecuencia esto se estudio en tumores epiteliales por lo accesible del tratamiento con carcinógenos, y porque se puede ir registrando el desarrollo tumoral. Los keratoacantomas son tumores benignos que en humanos presentan una regresión espontanea total, despues de un rapido crecimiento inicial lo que permite identificar oncogenas cuya acción no es suficiente para mantener el fenotipo tumoral. Se aplicaron 2 dosis por semana del 7,12-dimetilbenzo[*a*]antraceno (DMBA), en las orejas de conejos de Nueva Zelanda y en 4 semanas, se detectaron tumores unos tuvieron una regresión espontanea con diferenciación de keratocitos y otros se volvieron malignos. Se desarrollaron keratoacantomas, algunos papilomas y carcinomas. El ADN de los keratoacantomas el de 2 papilomas y 2 carcinomas transformo las células NIH-3T3 e hibrido con el oncogene c-Ha-ras, pero no con Ki-ras ni con N-ras, en las NIH-3T3 transformadas se detectaron mayores niveles de ARNm de c-Ha-ras y de p21 que en células normales. Por otro lado se analizaron muestras de 18 keratoacantomas humanos cuyo ADN se transfecto en células NIH-3T3 y las transfectadas originaron tumores en ratones sin sistema inmune y en el ADN humano se detecto una mutación de AT - TA en el codon 61 de c-Ha-ras. Es interesante que los tumores que tuvieron regresión, incluyeran células diferenciadas, pues ras se considera relacionado con la diferenciación celular. Este es el primer reporte de oncogenes ras en tumores benignos humanos.

SIMI, E.; MULLER, W.; PATTENGILL, P.; YERLES, I.; MALLACK, R. y LEDER, P. 1987. Coexpression of MYC, Ha-ras, and MYB in myc genes in transgenic mice: Synergistic action of oncogenes in vivo. Cell 49:465-470.

Se determino la cooperatividad entre los oncogenes myc y ras in vivo, usando un plasmido con el oncogene v-myc junto al promotor del virus de tumor mamario de ratones, regulable con hormonas en células germinales de ratones; estos fueron normales al nacer, expresaron v-myc en gran cantidad y después desarrollaron tumores mamarios y algunos linomas indicando que v-myc es necesario pero no suficiente para inducir la tumorigenesis. Por otro lado, otro plasmido con el mismo promotor pero con v-Ha-ras se inyectó en el goteo de ratones y se desarrollaron 13 cepas de ratones transgénicos que segregaron este gene a la descendencia con una proporción mendeliana. Los ratones tuvieron gran cantidad del ARNm de v-ras en tejido mamario, glándulas de Harderian (situadas en los ojos), en glándulas salivales y en vesículas sebáceas en los machos los mismos tejidos donde se expresa v-myc en las cepas de ratones con v-myc aunque los ratones con v-myc no presentaron tumores en glándulas salivales. Los ratones con v-ras nacen y se desarrollan normalmente, algunos con exoftalmia por hipertrofia de las glándulas de Harderian, y en algunos hubo un crecimiento hasta de 25 veces, de la glándula de Harderian. En ratones de 10 de las 13 cepas se presentaron adenocarcinomas mamarios y de glándulas salivales así como algunos linomas. Se hizo una cruce entre ratones con v-ras y ratones con v-myc, y los descendientes fueron normales al nacer similares a los ratones con v-ras, y también desarrollaron adenocarcinomas y linomas, pero con mayor rapidez, pues en algunos casos aumento el tiempo de desarrollo hasta 3 veces, y ningún raton hembra queda libre de tumores mamarios por mas de 161 días. Esto indica que existen tejidos específicos donde los oncogenos ras y myc pueden existir en forma críptica, y otros tejidos donde su expresión induce tumores; sin embargo al actuar en forma conjunta, el incremento en el desarrollo tumoral resulta mayor que si solamente se sumaran sus efectos.

ROOP, D. A., LEWIS, D. E., TAMBOURIN, E. E., STRICKLAND, J.,
MARTIN, J. A., SARGENT, M., SPANGLER, E. F. y MISRA, S. H.
1986. An efficient Harvey and Sarcoma provirus bearing
tumors on mouse epidermal tissue. Nature 323:688-691.

En el transcurso del desarrollo de todos los epiteliales, gene-
ralmente aparecen tumores benignos o papilomas previos a los tuma-
res malignos, indicando que ocurren cuando ocurre, o eventos duran-
te la carcinogénesis. La detección de p21 en papilomas, sugiere
que la mutación en este gen puede ser el primer evento, da-
do que ras está implicado en la proliferación celular, que es car-
acterística en los papilomas. Se estableció anterior en kerati-
nocitos infectados con el virus de sarcoma de Harvey, y el ADN de
algunos indujo la transformación de células NIH-3T3, y los que no
la indujeron se combinaron con fibroblastos dérmicos frescos y se
injertaron en la piel de ratones carenciales de sistema inmune, en
los cuales se desarrollaron papilomas al cabo de varias semanas.
En los papilomas se registraron niveles altos del ARNm del oncoge-
no viral y p21 viral se detectó en la parte basal de la epidermis
de los papilomas. Esto indica que la activación oncogénica de ras
es suficiente para inducir tumores benignos.

BROWN, K., QUINTANILLA, M., RAMSDEN, H., KEAR, I. R., YOUNG, D. y
BALMAIN, A. 1986. *ras* genes from Harvey and BALB murine
sarcoma viruses can act as initiators of two stage mouse skin
carcinogenesis. Cell 46:447-454.

La carcinogénesis se considera un proceso de múltiples pasos
el número de los cuales varía según la célula pero al menos se re-
quiere la iniciación y progresión y en algunos de estos pasos pug-
de estar implicado algún oncogeno. Existen ciertos agentes quími-
cos que inducen ambos pasos y se investiga en cuales pasos pueden
actuar los oncogenes ras. En la piel de ratones se hicieron heri-
das que se infectaron con los virus de Harvey y de BALB y después
se les aplicó el 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetato (TPA), y 4-6
semanas después se desarrollaron papilomas. Los ratones tratados
con DMBA en lugar de virus, y después con TPA, desarrollaron papi-
lomas luego de 7 semanas; los papilomas inducidos con ambas técni-
cas fueron similares. El desarrollo de papilomas se indujo aun
cuando el TPA se administró 4 meses después de la iniciación vi-
ral, indicando que las células mantenían la capacidad de volverse
malignas. Algunos papilomas inducidos con virus y TPA, mostraron
regresión pero no desaparecieron y algunos de estos después tavi-
ron una rápida malignización creciendo en forma invasiva como car-
cinomas indicando que en estos papilomas probablemente existen
merozas y diversas poblaciones celulares, y el surgimiento de los
carcinomas resulta de algún evento que ocurre en una o pocas celu-
las. En los carcinomas se detectó una mayor cantidad de ARNm del
ras que en los papilomas. La iniciación con el virus no indujo
tumores malignos, pero con el tratamiento con TPA surgieron tuma-
res con mayor frecuencia, y cuyo crecimiento fue más rápido, que
con el tratamiento con DMBA como iniciador, y TPA como promotor.
Es probable que p21 y TPA actúen en diferentes pasos de una misma
vía metabólica, y se concluye que la acción de los oncogenes ras,
es necesaria para iniciar un proceso maligno, pero no resulta su-
ficiente como para concluirlo.

YASWEN, F., GOYETTE, M., SHANK, P. R. y FAUSTO, N. 1985.
Expression of c-Ki-ras, c-Ha-ras and c-myc in specific cell
types during hepatocarcinogenesis. Mol Cell Biol 5:780-786.

En la hepatocarcinogenesis se ignora cuales celulas originan los tumores; algunas hipotesis explican que los hepatocitos maduros se "desdiferencian", readquiriendo características de celulas fetales; otras hipotesis sugieren que existen "celulas troncales" en higados maduros, que proliferan y no se diferencian. Las celulas ovales, frecuentes al inicio de la carcinogenesis son tal vez las celulas troncales, pues tienen proteinas fetales y adultas, y pueden ser celulas de transicion. Se estudio la ultima hipotesis alimentando ratas S-D con el carcinogeno etionina y se extrajo el higado a las 2-25 semanas tambien con fetos de rata y ratas a los 3-14 dias de edad pues el higado de ratas termina su desarrollo a los 28 dias y los hepatocitos solo sintetizan ADN o se dividen en la vida una o 2 veces mas, pero no pierden la capacidad de replicarse durante la regeneracion del higado al cortarle una porcion. En celulas ovales se analizo el ARNm de H-ras que aumento levemente durante la carcinogenesis, c-myc que aumento a las 2 semanas y a las 16 semanas fue 6 veces mayor que en las controles, y Ki-ras que fue aumentando de las 2 a las 17 semanas cuando llego a 10-20 veces mas que en controles. Los tumores aparecen a las 20-25 semanas de administrar etionina. En hepatocitos el ARNm de K-ras aumenta a las 2 semanas y luego decrece, en higados fetales llega al maximo a los 17 dias de gestacion, decrece marcadamente a los 20 dias de gestacion y 3 dias antes del nacimiento, H-ras tambien llega a su maximo a los 17 dias y luego decrece, pero no tanto como K-ras y c-myc alcanza el maximo a los 17 dias, y tambien decrece despues. Esto indica que la expresion de los 3 genes decrece conforme progresa el desarrollo del higado y decrecen al final de la carcinogenesis cuando tal vez impidan la diferenciacion de las celulas ovales, lo que apoyaria la hipotesis de celulas troncales.

DIXON, L. H., SHENKMAN, L., FRIEDBERG, A. 1986. "Concomitant K-ras and Heras gene point mutations in the NIH-3T3 lymphoma cell line." *Cell* 45:223-228.

La transgénesis puede inducirse con carcinógenos químicos o físicos, como radiaciones. Se estudió el efecto de los dos tipos de inducción en la activación de oncogenes por medio de la fusión génica, e inyectando células con plásmidos NIH-3T3 en ratones B6/J y en RF/J. De las ratonas B6/J algunas produjeron tumores y en las RF/J se desarrollaron 72 linfomas de tipo T, 17 de los cuales transfirieron con células NIH-3T3. Con NIH se indujo el 51% de los tumores con capacidad de transformar las NIH-3T3, con radiaciones, el 34%. Se hibridó el ADN de los 17 tumores de diversos bandos, no se detectaron Heras, Fos, Myb, c-myc, neu, src, myb, fgf ni c-myc. En 22 de los tumores inducidos con NIH y en 7 inducidos con radiaciones, se detectó Heras con mutación del codón 12. Heras se encontró con mutación del codón 12 en un tumor inducido con radiaciones y en 3 tumores inducidos con NIH. Heras presentó varias mutaciones. En 1 tumor, en el codón 12, 1 tumor más en el codón 12, y otros 5 linfomas, en el codón 61, y de estos, 3 tuvieron cambio de GAA a GAA y 1 de GAA a CTA. Las mutaciones del codón 12 y 13 fueron todas de GGT (Gly) a GAT (Asp). En 1 tumor la mutación del codón 12 de Heras se detectó en las células NIH-3T3 transformadas, pero no en el ADN tumoral; se estudió de nuevo el ADN tumoral, y se encontró también K-ras con mutación del codón 12. Se estudiaron todos los tumores con Heras activo, y se encontró que en el tumor con la mutación GAA - CTA del codón 61 de Heras, también existía mutación en K-ras. En 4 tumores con mutación en Heras, hubieron muy bajos niveles del alelo normal, indicando una posible pérdida del alelo normal. Heras es el más frecuentemente activo en los tumores de piel, pero no se detectó, lo que tal vez indica que existe cierta especificidad de tejidos susceptible a un oncogene ras en particular. Fueron más numerosos los tumores con Heras activo que con K-ras, pero las mutaciones de Heras fueron más variables, y al menos en 2 tumores, K- y heras estuvieron activos, así es que una de las 2 mutaciones no fue un evento inicial. Es posible que la activación de K-ras sea el evento inicial, y ya sea la pérdida del alelo normal o bien, la activación de Heras, sea el evento que actúa en forma cooperativa para completar el proceso tumorigénico.

ONCOGENES RAS EN MIZANCO

Los estudios hechos en el genoma humano de los oncogenes ras han sido muy numerosos, dada la importancia clinica de investigar el origen y tratamiento del cancer, pero por otro lado se han visto un tanto limitados, pues se obvio que en humanos no pueden inducirse desarrollos tumorales como en animales, pero establecer la etiologia del cancer, ni se pueden nielar los tumores para identificar, fuera de toda duda, los estadios de la carcinogenesis, se haya produciendo durante el desarrollo larval. Estas limitaciones son las que se han puesto en evidencia al la aplicacion de los oncogenes ras en un evento responsable de enfermedad en el proceso neoplasico, o si es uno de las consecuencias del mismo, pues si bien en animales todo parece indicar que su activacion es un evento implicado en la induccion tumoral no siempre se pueden aplicar directamente los resultados obtenidos en los modelos animales al caso de los humanos ademas de que siempre faltara la verificacion y reproducibilidad de los resultados, un requisito indispensable de la investigacion.

Unicamente se han logrado efectuar estudios que se aproximan a los que se realizan en animales en el caso de los tumores de la piel de personas muy expuestas al sol, cuya piel muestra los efectos de la radiacion solar y donde existe una alta probabilidad de que ese haya sido el agente tumoral; en estos tumores han sido detectados oncogenes ras activos (Ananthaswamy y cols., 1980)

Los oncogenes ras en muestras de genoma humano, se han detectado mediante las tecnicas mencionadas a lo largo del texto, las cuales se siguen perfeccionando pues se ha visto que en muchos reportes referentes a la incidencia de oncogenes ras en neoplasias humanas, es muy probable que no se hayan detectado todas las alteraciones realmente presentes en las celulas malignas, debido a varias razones tales como la degradacion post-quirurgica del ADN de las celulas en las muestras de neoplasias, las escasas celulas malignas que suelen contener estas muestras que ademas estan mezcladas con celulas normales muy diversas, lo que reduce la probabilidad de detectar los posibles oncogenes ras activos, y por otro lado las desventajas de la tecnica mas empleada para esta deteccion los ensayos de transfeccion en celulas NIH-3T3, que al ser inmortales de alguna manera han iniciado un proceso transformante pues suelen transformarse espontaneamente aunque con baja frecuencia, pero que obviamente alteran los resultados, ademas en el caso del oncogene c-Ki-ras, por su gran tamaño dificilmente logra transfectarse completo y transformar celulas NIH-3T3. Para incrementar la sensibilidad de esta tecnica, si la muestra incluye pocas celulas malignas, en ocasiones se inyectan las celulas NIH-3T3 transfectadas, transformadas o no en ratones para observar posibles desarrollos tumorales sin embargo esto implica la intervencion de muchos otros factores, pues tambien los ratones pueden desarrollar tumores por otras causas, complicando aun mas las observaciones.

La hibridacion del genoma tumoral con sondas de ADN requiere cierta cantidad de ADN, y cuando el numero de celulas malignas de la muestra es insuficiente para alcanzar la cantidad requerida de ADN, no logran detectarse eficientemente los oncogenes ras presentes. Este metodo se ha perfeccionado mediante la accion de la ADN

polimerasa que amplifica el fragmento con el oncogene ras que desea detectarse, y al generarse varias copias del mismo, aumentan las probabilidades de que lo detecten las sondas de ADN.

Mediante el empleo de estas nuevas técnicas se han detectado oncogenes ras activos con mayor frecuencia que la reportada en estudios anteriores, en especial del oncogene c-Ki-ras que se ha reportado activo con mutaciones puntuales en un 40% de tumores colorectales (Bos y cols., 1987); e incluso, se han encontrado mutaciones que no se habían detectado, como la mutación del codón 12 del oncogene c-Ha-ras en leucemias (Toksoz y cols., 1987), así como la activación conjunta de c-Ki-ras y N-ras en un mismo genoma. (Farr y cols., 1986).

Otra modificación a los métodos más utilizados para detectar oncogenes ras, es mediante sondas de ARN, con la secuencia normal del transcrito de los genes ras, que al hibridar con el ARN de un oncogene con una mutación es reconocido y cortado por la RNAasa-A, con lo cual se obtienen fragmentos de diversos tamaños, que indican la existencia de una mutación puntual en un oncogene ras. Esta técnica también ha permitido establecer que la frecuencia del oncogene c-Ki-ras activo en los tumores colorectales es mayor que la que se había reportado (Forrester y cols., 1987).

Como se ha visto los oncogenes ras pueden activarse mediante mutaciones puntuales en el codón 12, 13, y 61, y también mediante la amplificación de los proto-oncogenes, que al parecer no es tan frecuente, o bien mediante alguna alteración en la célula que propicie el aumento en la expresión de genes ras, y consecuentemente el aumento en la proteína p21 oncogénica que puede ser directamente, por el aumento en la transcripción, y por lo tanto en la producción de p21, o bien indirectamente, por la falta de algún mecanismo que normalmente impida que ocurra este incremento ya sea degradando el exceso de ARNA de genes ras, o de p21, o inhibiendo a nivel de ADN en el promotor del gene ras que esté expresando niveles anormalmente elevados. Se han detectado niveles elevados de p21 en numerosas neoplasias humanas tales como adenocarcinomas de pulmón, estómago, recto y colon, en carcinomas mamarios, uterinos hepáticos, colorectales, epiteliales, en adenomas tiroideos, linfoma de Burkitt sarcomas de nódulos linfáticos, y también en tumores benignos mamarios y epiteliales (keratoacantomas). (Datos obtenidos del Archivo General de Oncogenes).

Existen también otros mecanismos de activación como la metilación del ADN de los genes ras que es un mecanismo de activación en general de los genes celulares, y que también activa los genes ras (Borrello y cols., 1986). Se ha reportado asimismo que la pérdida del fragmento adyacente a la secuencia de c-Ha-ras, conocido como exón -1, activa dicho gene (Cichutek y Duesberg, 1986). Los oncogenes ras no parecen estar asociados a ningún tipo de neoplasia en particular, pues se encuentran activos en todo tipo de tumores, aunque se ha encontrado que existe una significativa incidencia de determinados oncogenes ras en ciertos tipos de cáncer, por ejemplo el oncogene N-ras se ha detectado en neoplasias de tipo hematopoyético como leucemias, con mayor frecuencia que los oncogenes c-Ha-ras o c-Ki-ras; Ha-ras se encuentra más frecuentemente que los otros dos en tumores mamarios, y Ki-ras, en tumores colorectales; esto sugiere que probablemente existe una determina-

da especificidad o susceptibilidad de algunos tipos de tejidos, a la acción de alguno de los tres oncogenes ras.

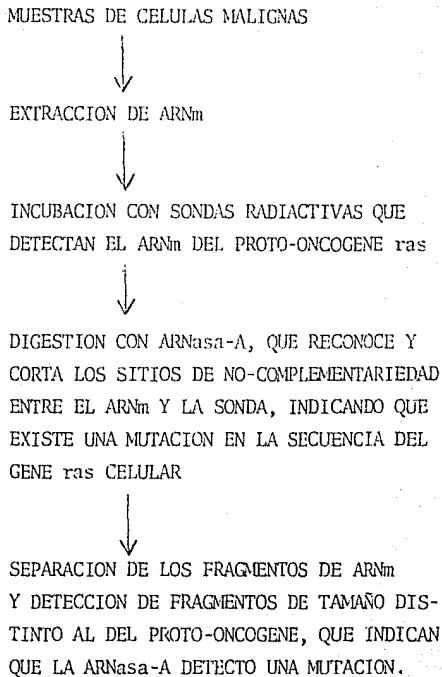
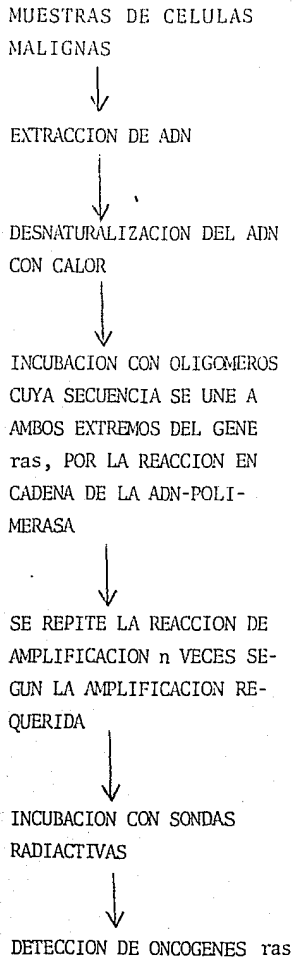
Los oncogenes ras son genes dominantes distintos de los llamados antioncogenes, aunque si se consideran antioncogenes a todos aquellos con capacidad de impedir que se exprese un proceso transformante, es de suponer que en las células normalmente existen antioncogenes, pues se sabe desde hace tiempo que existen en las células, ciertos mecanismos para evitar ser afectadas por alteraciones, sobre todo cuando ocurren mutaciones u otros daños en el ADN. Existen evidencias de que las células tienen mecanismos para tratar de contrarrestar los efectos de los oncogenes ras, que serían los antioncogenes, como lo es la elevada incidencia de tumores en que se ha detectado la pérdida de un alelo del gene ras (Theillet y cols., 1986), lo que ha sido descrito como un mecanismo activante, cuando el alelo normal es el que reprime la oncogenicidad del alelo mutante, pero esto es en el caso de oncogenes recesivos, por lo que es difícil explicar como es que el alelo normal impide que se exprese un oncogene dominante ras activo, pero de alguna manera el alelo normal parece participar, pues cuando se fusionan las células malignas y células normales, las células híbridas presentan un fenotipo normal, como se describió en el capítulo de tumorigénesis animal.

Los oncogenes ras no parecen estar relacionados con el grado de desarrollo tumoral, pues se detectan en todas las etapas de la tumorigénesis (Yokota y cols., 1986), pero *in vitro* y en animales se ha visto que su activación es necesaria, pero no suficiente para inducir la tumorigénesis; en el caso de humanos existen evidencias a favor de esta hipótesis, pues en muestras de leucemia, se han detectado muestras con mutación en K-ras y N-ras en un mismo genoma; cada mutación está en un alelo, y así una célula tiene 2 tipos de proteínas p21, ambas activas, lo cual indica que alguna de las dos mutaciones no pudo ser un primer evento en el proceso neoplásico; curiosamente, en estos pacientes durante las fases de remisión de la enfermedad, dejaron de detectarse las mutaciones. (Farr y cols., 1988)

En primera instancia, se descarta la posibilidad de que los oncogenes ras intervengan en algún tipo de predisposición al cáncer por su carácter dominante, pero el que existan variaciones en la región adjunta característica del gene c-Ha-ras, que se detecta como un polimorfismo de fragmentos de diverso tamaño, algunos de los cuales existen en células malignas con una incidencia significativa, puede considerarse una evidencia en contra, aunque es difícil considerarla como prueba de que los oncogenes ras están involucrados directamente con la predisposición al cáncer (Lidereau y cols., 1986) pero si lo están entonces estos datos, junto con los experimentos con anticuerpos que detectan ciertas proteínas oncogénicas en muestras de orina, con los cuales se ha logrado al menos en un caso, la detección de un desarrollo tumoral antes de que se manifieste (Niman y cols., 1985), implicarían que la importancia del estudio de los oncogenes ras, va más allá del nivel de la investigación celular y genética; significaría un nuevo y muy importante enfoque para tratar los casos de neoplasias e incluso para diagnosticarlos en etapas tempranas, disminuyendo así su índice de mortalidad.

FIGURA 9

TECNICAS DE DETECCION DE ONCOGENES ras EN CELULAS MALIGNAS



CORTE CON ARN-ASA-A

REACCION EN CADENA DE LA ADN-POLIMERASA

TABLA 2

MUTACIONES PUNTUALES EN EL CODÓN 12 DE LOS ONCOGENES RAS

ONCOGENE	AMINO ACIDO	TUMOR
c-Ha-ras	Gly	genotipo humano normal
v-Ha-ras	Arg	virus de sarcoma murino de Harvey
c-Ha-ras	Val	línea T24 de carcinoma de vejiga humano
c-Ha-ras	Val	línea EJ de carcinoma de vejiga humano
c-Ha-ras	Glu	carcinoma mamario inducido con MMU en ratas
c-Ha-ras	Asp	carcinoma hepático inducido con IO en ratas
c-Ha-ras	Cys	adenocarcinoma hepático espontáneo de ratas
c-Ha-ras	Cys	Nefroblastoma inducido con MAV en aves
c-Ha-ras	Asp	línea Hs0578 de carcinosarcoma mamario humano
c-Ha-ras	Val	línea 382 de carcinoma pulmonar humano
c-Ha-ras	Val	leucemia mieloide aguda humana
c-Ki-ras	Gly	genotipo humano normal
v-Ki-ras	Lys	virus de sarcoma murino de Kirsten
c-Ki-ras	Cys	fibrosarcoma inducido con 1,8-DNP en ratas
c-Ki-ras	Cys	fibrosarcoma inducido con MCA en ratones
c-Ki-ras	Asp	timoma de rata inducido con radiación gamma
c-Ki-ras	Cys	línea LU-65 de carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Arg	adenocarcinoma de páncreas humano
c-Ki-ras	Asp	línea A427 de carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Asp	línea A1165 de carcinoma pancreático humano
c-Ki-ras	Asp	línea A1663 de tumor de vejiga humano
c-Ki-ras	Ser	línea A549 de adenocarcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Val	línea SW480 de adenocarcinoma de colon humano
c-Ki-ras	Cys	línea Calu-1 de carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Arg	línea A-2182 de carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Asp	línea Panc1 de carcinoma de páncreas humano
c-Ki-ras	Cys	línea PR371 de carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	Cys	línea SW-1098 de carcinoma de colon humano
c-Ki-ras	Arg	línea A1698 de carcinoma de vejiga humano
c-Ki-ras	Cys	línea SE-CD-1 de carcinoma de colon humano
c-Ki-ras	Val	línea SW-620 de carcinoma de colon humano
c-Ki-ras	Ala	línea SW-116 de carcinoma de colon humano
c-Ki-ras	Ser	tumor gástrico humano
c-Ki-ras	Ser	línea 81804 de carcinoma de vejiga humano
N-ras	Gly	genotipo humano normal
N-ras	Asp	leucemia mielógena aguda humana
N-ras	Asp	timoma inducido con MMU en ratones
N-ras	Cys	leucemia mielocítica aguda humana
N-ras	Ser	leucemia mielocítica aguda humana

Datos obtenidos del Archivo General de Oncogenes

TABLA 3

MUTACIONES PUNTALES EN EL GENETIP DE LOS ONCOGENES RAS

ONCOGENE	AMINO ACIDO	TUMOR
c-Ha-ras	Glu	genotipo normal humano
c-Ha-ras	Leu	línea SK-2 de melanoma humano
c-Ha-ras	Leu	línea Hc242 de carcinoma pulmonar humano
c-Ha-ras	Arg	tumor epitelial humano
c-Ha-ras	Leu	tumor urotelial humano
c-Ha-ras	Leu	línea JET25 de carcinoma de vejiga humano
c-Ha-ras	Leu	línea SK-NEL-145 de melanoma humano
c-Ha-ras	Arg	línea JET24 de carcinoma renal humano
c-Ha-ras	Leu	teratocarcinoma benigno humano
c-Ha-ras	Leu	teratocarcinoma benigno inducido con DNA en conejos
c-Ha-ras	Leu	carcinoma epitelial inducido con DNA/TPA en ratones
c-Ha-ras	Leu	papilomas benignos epiteliales inducidos con DNA/TPA en ratones
c-Ki-ras	Glu	genotipo normal humano
c-Ki-ras	His	carcinoma pulmonar humano
c-Ki-ras	His	línea PC10 de tumor pulmonar humano
c-Ki-ras	Asp	línea OVCA-4 de carcinoma de ovario humano
c-Ki-ras	His	línea 1085 de rabdomiosarcoma humano
c-Ki-ras	Leu	línea RT-EM de leucemia linfocítica aguda humana
c-Ki-ras	Arg	línea G12-Lu-1 de carcinoma pulmonar humano
N-ras	Glu	genotipo normal humano
N-ras	His	leucemia mielocítica aguda humana
N-ras	Arg	leucemia mielocítica aguda humana
N-ras	Arg	línea M1-H225 de síndrome múltiple humano
N-ras	Lys	leucemia mielocítica aguda humana
N-ras	His	leucemia mielocítica aguda humana

ALTERACIONES PLASMATICAS EN EL SUERO DE DE LOS CÁNCERES HNC

ONCOGENE	AMINO ACIDO	ENFERM
M-rac	Val	genotipo normal humano
M-rac	Asp	leucemia mielógena humana
M-rac	Arg	carcinoma rectal humano
M-rac	Arg	síndrome de mielodisplasia humana (preleucemia)
M-rac	Cys	linfoma no-Hodgkin humano
M-rac	Asp	leucemia no linfocítica humana
M-rac	Asp	leucemia mielocítica aguda
c-Ki-rac	Asp	síndrome de mielodisplasia humana (preleucemia)

Datos obtenidos en el Archivo General de Oncogenes

Tabla 4

ONCOGENES RAS ONCOTRANSFORMADOS

ONCOGENE	TUMOR
c-Ha-ras	adenocarcinoma humano
c-Mu-ras	tumor eóvrico uterino humano
c-Ki-ras	carcinoma pancreático humano
c-Ki-ras	carcinoma coláico
c-Ki-ras	carcinoma de ovario
c-Ki-ras	tumor de nodulos linfáticos
c-Ki-ras	carcinoma gástrico
c-Ki-ras	carcinoma de vejiga
c-Ki-ras	línea H1-28 de células transformadas con radiación cosmic
c-Ki-ras	tumor adrenal de ratón
c-Ki-ras	adenocarcinoma de peneis
c-Ki-ras	carcinoma epitelial
H-ras	Línea HCF-7 de carcinoma mamario

Datos obtenidos del Archivo General de Oncogenes

ANONYMOUS. H. M. PRICE, J. P. GARDNER, L. H. WALKER, R. J. 1968. Detection and identification of actinic keratosis in human skin tumors involving an abnormal body fluid. Can Res 49:3341-3344

En superficies de piel se ha observado que ciertos tipos de queratosis y fimoas que actúan como estrogénos, también son carcinógenos. Y es frecuente que la incidencia tumoral cutánea se relacione con los rayos UVB. La luz ultravioleta causa severos daños al ADN en animales causa tumores epiteliales y se considera el principal responsable del cáncer de la piel en humanos, por lo que se investigó si en los tumores epiteliales de humanos, se encuentran oncogenes ras activos. En estudios de 3 carcinomas epiteliales, 7 de células escamosas y 1 de células basales en los que se expusieron al sol directo, orales, etc., de pacientes con largo tiempo de exposición a los rayos solares, lo que se estableció entrevistando a los pacientes, y por la presencia en los sustratos de señales indicadoras como queratinas anómalas, hiperqueratinización, pigmentación, eritema, y lentigo solar. En la búsqueda de ADN de las células tumorales se utilizaron pBR322, y las transformadas a su vez se investigaron en ratones normales de células 3T3. Ninguna de las muestras se desarrollaron tumores en los ratones. Las sondas de ADN de K- y H-ras se detectaron alteraciones, y después se detectaron ras, ras, ras, ras, ras, ras, ras, ras. Se detectaron alteraciones de c-Ha-ras en las 6 muestras pero sólo en una se determinó la amplificación de c-Ha-ras y no logró definirse el tipo de alteraciones en las demás muestras, tal vez debido a lo escaso de las muestras. Se concluye que la radiación solar en los humanos actúa como un fuerte agente tumoral, muy probablemente mediante la activación de los oncogenes ras.

BOB, J. L., FERRARI, M. M., FRITZBERG, A. M., VILLANAS DE VRIES, H., and BOB, J. H., *MUTATION IN THE c-KI-RAS GENE IN HUMAN COLORECTAL CANCERS*. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature 337:199-207.

En numerosos reportes se han detectado oncogenes ras activos en un 10-20% de las neoplasias humanas, mediante ensayos de transfección en células NIH-3T3, pero es probable que en algunas de las muestras reportadas como negativas, en realidad los oncogenes ras sí estaban activos, pero no se detectaron ya sea por la presencia de diversas células mezcladas con las malignas, o por que al extraer ese químicamente la neoplasia, el tiempo transcurrido hasta la extracción y análisis del ADN, pueda haber ocasionado su degradación, y en el caso del oncogene c-Ki-ras, por su gran tamaño, difícilmente se conserva íntegro al hacer la transfección. Por ello, para determinar la incidencia real de oncogenes ras activos en tejidos colorectales sin estos problemas, se eligieron muestras de zonas con numerosas células malignas de los carcinomas colorectales humanos, se extrajo el ADN de 27 muestras que abarcaron desde tumores benignos (adenomas) hasta metástasis, y se empleó un nuevo método, para el cual se incubó con polímeros en presencia de ADN polimerasa para amplificar segmentos de interés, que se hibridaron con sondas de ADN. Se detectaron así, mutaciones somáticas en 11 de los 27 tumores, de las cuales 10 fueron mutaciones del oncogene c-Ki-ras y de éstas, 7 fueron del codón 12: 5 de la glicina normal a ácido aspártico, 2 a valina, 1 a serina y 1 a cisteína. En 3 de ellos la detección fue muy débil, indicando la posible pérdida del alelo normal. En otro caso hubo una mutación del codón 61, de la glutamina normal a histidina, y en 1 caso más, hubo mutación del codón 12 de N-ras, de glicina a cisteína. No se observó amplificación de ningún gene ras ni mutaciones del tejido normal de los pacientes, pero en 5 casos la mutación del codón 12 de c-Ki-ras también se presentó en el tejido adenomatoso, indicando que la mutación precedió al desarrollo tumoral, pues hay evidencias de que numerosos carcinomas colorectales surgen a partir de adenomas preexistentes, por lo que la activación de ras, ha de ser uno de los primeros eventos en la tumorigénesis, que continúa presente durante todo el desarrollo tumorigénico posterior. La activación preferente de c-Ki-ras en tumores colorectales, así como la frecuente detección de N-ras en leucemias, probablemente indique que existe cierta especificidad de tejidos a un oncogene ras en particular.

FAVRE, G. W., and J. W. HODSON, JR. "POLYMERIZATION OF POLYMERIZABLE DNA." 1978. Analysis of RNA gene substitution in the DNA double helix by polymerase chain reaction and oligonucleotide probes. Proc Natl Acad Sci USA 75: 127-130.

La infección por el virus de la hepatitis B en el estudio postmo de un tumor sólido, y en los sueros de los enfermos tanto células normales como malignas, aunque el tipo de cambio de que los sueros tras de su síntesis espontánea, y podría considerarse un sustrato de un mismo mecanismo, durante la evolución de la enfermedad de hepatocarcinoma, como un fenómeno de origen común a los de liver, por lo cual se estudia más en detalle en adelante, considerando el RMI de los sueros a la acción de la RNW polimerasa, la cual se hizo a todos los del suero, así el suero que demuestra defectos, y mediante un análisis en cadena, explica este fenómeno para determinar la probabilidad de defectos, el RMI sufrió los cambios de oligonucleótidos con las secuencias de oncogenes. De los 22 pacientes con sueros estudiados, 8 en suero se registraron mediante la detección de mutaciones durante las sucesivas fases de remisión y recaída de la leucemia. En 14 de los 22 sueros se detectó un mutaciones en H-ras, principalmente del codón 12, la mutación más común que de la glicina normal, a ácido aspártico. 2 sueros presentaron mutación del codón 13 de H-ras también de GGT - Asp, y 4 mutación de los 2 mutaciones en H-ras, en los codones 12 (Gly - Asp) y 13 (Gly - Asp), y otras 2, en los codones 12 (Gly - Tyr) y 61, uno de ellos a Tyr, y el otro a His. En estas 4 sueros cada mutación ocurrió en un sitio distinto, y cada uno de los dos sitios codificó una pila diferente, pues la alternación de una sola proteína en 2 de sus sitios críticos, no sólo vía cambio, sobre todo si las alteraciones son en los codones 12 y 13. En las muestras obtenidas durante las fases de remisión, no se detectó ninguna de las mutaciones registradas durante la fase activa de la enfermedad, incluso en el paciente con mutaciones en los codones 12 y 61, no se encontró ninguna mutación en las fases de remisión, y en las muestras obtenidas al volver a recaer tampoco se detectaron las mutaciones. Esto puede deberse a que el tratamiento realmente erradicó las células mutantes, en cuyo caso no se explicarían las recaídas, o bien, tal vez la activación de H-ras no sea un evento inicial en la carcinogénesis, como se ha reportado en los casos en que se han detectado H-ras y H-ras activos en el mismo genoma, donde la activación de H-ras parece el evento inicial, y la activación de H-ras el acompañamiento; en esos reportes no se ha seguido la evolución de la enfermedad, por lo que no puede aún determinarse si los genes ras realmente se activaron durante el desarrollo de la enfermedad, o después.

FORRESTER, K., ALMOGUERA, C., RON, K., CRISTLO, W. D., SERRANO, H.
.1987. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human
colon tumorigenesis. Nature 327:298-303.

Debido a la imposibilidad de experimentar con seres humanos, no se ha logrado demostrar que la activación de los oncogenes ras cause la patogénesis del cáncer humano, a diferencia de la activación frecuente, reproducible y predecible de los oncogenes ras en animales. Para trabajar en estas circunstancias se desarrolló un nuevo método de detección de mutaciones puntuales basado en la capacidad de la RNAasa-A de reconocer y cortar los sitios donde la unión RNA - RNA no es total, e indican una mutación puntual; los ARNm de las células analizadas se hibridaron con sondas con la secuencia de ARN de proto-oncogenes y se cortan con ARNasa, y se obtuvieron fragmentos de diferente tamaño, que indicaron mutaciones puntuales. Se analizaron 66 tumores primarios de colon, hibridando con la sonda de c-Ki-ras, que es el oncogene activo mas frecuente de los 3 oncogenes ras en tumores de colon, y en 26 muestras se encontraron mutaciones en el codón 12: 8 de las mutaciones fueron en la primera posición del codón 12 y 18 en la segunda. Se transfirió el ADN de 30 de estas 66 muestras en células NIH-3T3 y sólo 6 transformaron las NIH-3T3, indicando una escasa sensibilidad de este método para detectar oncogenes K-ras activos. No hubo amplificación, ni otra alteración distinta de la mutación del codón 12. Uno de los tumores sin mutación del gene K-ras transformó células NIH-3T3, por lo que posiblemente otro oncogene ras se encontraba activo en esta muestra. El ADN de otros dos tumores con mutación de K-ras también transformó las NIH-3T3, y al analizarlos se detectó al N-ras activo, es decir, dos oncogenes ras activos en el mismo genoma. Es posible que la mutación del codón 12 del oncogene c-Ki-ras, que ha de ser un evento inicial en la transformación, confiera alguna ventaja a la célula maligna, y la activación de N-ras, que debe ser posterior, complemente la acción tumorigénica.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

OSBORN, M. G., GIBBY, M. A., FERRARINI, T., DUBOVI, G., MORSE
LILLY, C. DE LA SERRE, G. 1987. DNA methylation affecting the trans-
forming activity of the *ras* oncogene. *Cell* 47:75-79

La metilación se correlaciona con una de las modalidades de regulación de la expresión génica: en las promotoras genes que estando hipermetilados no se expresan. Se investigó si la metilación tal vez es un mecanismo de regulación de oncogenes. Se utilizó un plásmido con el oncogeno *c-Ha-ras* humano con mutaciones en el codón 12 y 2 metiltransferasas bacterianas encargadas de metilar al ADN unas muestras del plásmido se metilaron con una de las enzimas, y otras muestras, se metilaron con las dos enzimas simultáneamente. Se transfirieron los plásmidos en células NIH-3T3, para registrar su actividad transformante y se observó que los plásmidos control sin metilar, y los que se metilaron con una metiltransferasa, mostraron prácticamente la misma capacidad transformante pero en los que hubo la doble metilación la oncogenicidad se redujo en un 80%. Al analizar el ADN de cada experimento se comprobó que el ADN aun seguía metilado de acuerdo a cada caso demostrándose que no se habían desmetilado los plásmidos en las células. Se incubaron células NIH-3T3 con agentes demetilantes, y se observó una transformación similar a la inducida por el plásmido oncogénico control, en todos los casos, indicando que había sido restaurada la expresión del oncogeno *ras*. Se verificó así directamente que la metilación es un mecanismo de regulación de los oncogenes *ras*, que muy probablemente puede ocurrir en las células.

CISNUTER, M., BUESERS, P. H. 1988. Harvey *ras* genes transform without mutant codons, apparently activated by truncation of a 5' exon (*in vivo*). *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2340-2344.

Los mecanismos conocidos de activación de los oncogenes *ras*, son la mutación puntual, amplificación, o sobre-expresión, aunque se desconoce como es que estos cambios originan la expresión dominante del gene por lo que se investiga la existencia de otro posible mecanismo de activación. Se transfirieron células NIH-3T3 con ADN del oncogeno y del proto-oncogeno *c-Ha-ras* humano, y *v-Ha-ras* viral y en todos los casos se indujo la transformación aunque con periodos de latencia variable. Se estudió la secuencia adyacente a los genes *ras* en el extremo 5' del genoma humano, de rata y del virus de sarcoma murino de Kirsten, Harvey, y Rasheed, y se encontró que en el proto-oncogeno existe una secuencia llamada *exon -1* ausente tanto en el oncogeno *c-Ha-ras* humano como en los genes virales. Al transferir el ADN de genes *ras* sin mutaciones, ni amplificación, ni sobre-expresión, pero sin el *exon -1*, las células NIH-3T3 se transformaron. Se concluye que existe otro mecanismo de activación de los oncogenes *ras*, que consiste en la delección

WORLD, J., TERPSTRA, J. C. H., VAN DER BEEK, M., DE HAAN, D.,
D. 1985, p. 3. 1985. Alterations of *myc*, *myb*, and *ras* proto-
oncogenes in human oral squamous and basal cell carcinoma. *Science* 231:246.

La mayor parte de los estudios sobre alteraciones de oncogenes en los tumores de lin. se centran en tumores malignos, pero es importante saber si en tumores primarios existen alteraciones similares. Por ello, se estudiaron 101 neoplasias humanas malignas y 7 benignas, que representan 21 diferentes tipos histológicos incluyendo 9 sarcomas, 71 carcinomas, 16 leucemias y 5 linfomas. En 70 casos, se pudo obtener muestras de tejido normal de los mismos pacientes, y 64 de dichas muestras fueron del mismo tejido de la neoplasia. Se hibridó con sondas de los oncogenes *c-myc*, *c-myb*, *c-fos*, *c-fra*, *N-ras*, *v-src*, y *c-mos* se se detectó ningún oncogeno activo en muestras de tejido normal. Se detectó *c-myc* amplificado, de 3 a 8 veces en 7 tumores primarios de colon, bronquios y estómago gástrico, y de 5 a 8 veces en 5 tumores metastásicos de cócculo ciego y amígdalas. En 4 tumores de los primeros estados de desarrollo, y en 2 metastásicos de colon, pulmón y mama se detectó la falta de un alelo de *myc*. En 4 tumores, 3 de los primeros estadios, y 1 metastásico (de colon, hígado, pulmón, y mama), un alelo de *myb* se detectó con misma intensidad indicando su posible pérdida o algún otro tipo de mutación. En un tumor particularmente agresivo, se encontró amplificado *c-fos*, la pérdida de un alelo de *c-fra*, y amplificación de *c-myc*. No se encontró *myc* activo en leucemias, sin embargo las mayores alteraciones de *myc* se detectaron en los tumores más agresivos, lo que sugiere que probablemente el grado de alteración de *c-myc* está relacionado con la agresividad tumoral; con *myb* y *ras* no se estableció una relación similar.

LIDEREBO, R., SANDOZ, G., BUCHHEIT, D., LINDENBERG, H., HANSEN, H.,
BESSE, J., GALLAGHER, R. 1982. High frequency of rare alleles of
the human c-Ha-ras-1 proto-oncogene in breast cancer patients.
JNCI 677-781

Cuando el genoma humano se corta con enzimas de restricción,
se obtienen fragmentos de cierto tamaño y cuando en el genoma se
detecta la presencia del gene c-Ha-ras-1, al cortar con las enzi-
mas BamHI, HpaII y HpaI, se obtiene su estructura completa, pero no
siempre en fragmentos del mismo tamaño, debido a que el gene humano
no c-Ha-ras-1 tiene una estructura repetitiva llamada VNr, que consta
de 28 pares de bases que se repite un número variable de veces,
según el número de repeticiones será la longitud de la región VNr
y por lo tanto el tamaño del fragmento de c-Ha-ras-1. Se estudió
esta variabilidad de los fragmentos en relación al cáncer, en 106
pacientes con tumores mamarios y 68 individuos normales, cuyo ADN
se cortó con las enzimas mencionadas. Se detectaron 4 fragmentos
con una frecuencia muy alta, los llamados alelos comunes, de 5.5,
7.0, 7.6 y 8.0 kpb, y 15 alelos raros de tamaños diferentes, des-
de 5.9 hasta 8.7 kpb. En los individuos normales los alelos comu-
nes constituyeron el 71% del total de alelos registrados, mientras
que en los pacientes con tumores mamarios la frecuencia de alelos
comunes fue de 59%. Los alelos comunes de 5.5 y 8.0 kb. se encon-
traron con una proporción significativamente menor en los pacien-
tes con cáncer que en individuos no afectados, y el alelo raro de
6.3 se detectó en 12 de los 208 alelos correspondientes a los 106
pacientes, y no se encontró en ninguno de los normales. Se ha re-
portado que la proteína oncogénica p21 de c-Ha-ras, se expresa en
el 80% de los tumores mamarios, por lo que el hecho de encontrar
un 41% de alelos raros en pacientes con cáncer mamario indica una
interacción entre la regulación de c-Ha-ras y las neoplasias ma-
marias, así como la posibilidad de que en un futuro, se puedan rea-
lizar estudios de tipo genotípico e inmunológico, que permitan es-
tablecer un pronóstico del cáncer.

NIRANI, H. L., TRENKLEIN, H. H., JR., GARDNER, H., WILKINSON, J. E., GARDNER, H. H., GARDNER, H. H. & WOOD, W. A. (1982). *Antibodies to ras, fes, raf, and src-related proteins in urine*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 694-698.

El estudio de los oncogenes, mediante nuevas técnicas para el diagnóstico y tratamiento del cáncer, permite que se recupere la extracción quirúrgica de la neoplasia, convirtiéndose en poco más al cáncer. Los oncogenes participan en la proliferación celular en animales y tal vez también en humanos aun o toda en algunos cánceres raros, lo que no puede demostrarse por no poder detectar anticorpos humanos. Para solucionar estas limitaciones se sintetizaron anticorpos con las regiones carboxiláticas de los oncogenes ras, fes, y fes el péptido de fes incluye los aminoácidos 107-107 de la proteína p55-ras, el de ras los aminoácidos 101 de p21-ras y el de ras, los aminoácidos 37-59, dominios a p21 de H y K-ras, y que difiere de H-ras en 1 aminoácido. Se inyecta en los peplidos sintéticos en ratones que genera un anticuerpo muy específico, que detectan muy eficientemente proteínas oncogénicas, a otras muy relacionadas son si perdieren su conformación original o están fragmentadas que no detectan. Los anticuerpos contra proteínas totales. En muestras de orina de pacientes con diversas neoplasias y en mujeres embarazadas anti-ras detectó 3 proteínas con pesos moleculares de 35 kD y 25 kD; p55-ras, p21-ras, anti-fes detectó p50-fes y p55-fes y anti-ras detectó p20-ras, p55-ras y p21-ras. En tumores mamarios se detectó 20 veces más p55-ras de lo normal, y 5 veces más proteínas fes; en una paciente con cáncer mamario, p55-ras varió hasta 50 veces en 1 mes, y en otra paciente las proteínas fes y p55-ras fueron más abundantes de lo normal y 3 meses después la paciente desarrolló cáncer mamario. Las proteínas no se detectaron hasta 30 veces más en tumores de próstata y vejiga, y también se encontraron en tumores cervicales, de pulmón y linfoma donde no se detectaban ras ni fes. En mujeres embarazadas las proteínas fes y sis casi no variaron, pero p55-ras tuvo variaciones hasta de 15 veces en 1 semana y al final del embarazo p55-ras y p21-ras fueron más elevados que al inicio. Las proteínas detectadas pueden ser de genes de células malignas o de células benignas, pero es poco probable que sean de genes ajenos que naturalmente sean afines debido a sus variaciones en casos de cáncer y embarazados; posiblemente son proteínas oncogénicas de las familias sis, ras y fes. La detección en mujeres embarazadas de proteínas ras, indica su acción en la proliferación celular de embriones humanos tal vez en un futuro estas proteínas u otras similares en un sencillo análisis de orina aporten datos para el diagnóstico de neoplasias como en la paciente que desarrolló el tumor e incluso permitían diagnosticar posibles problemas fatales.

El estudio de los genes ras se inició con el objetivo de conocer mejor los mecanismos que llevan a una célula normal a transformarse hasta adquirir las características de una célula maligna; los estudios con este objetivo han generado interesantes aportaciones para diversas ramas de la medicina, no solo para la oncología, sino también para la medicina preventiva, clínica, la fisiología, la fisiología humana, etc. Sin embargo, en el transcurso de dichos investigaciones, los surgidos hallazgos que trascienden al ámbito puramente médico para incidir en disciplinas científicas biológicas tan muy diversas, pues aparte del estudio de la biología molecular, también se han obtenido aportaciones al estudio de la evolución, la ecología, la biología, la fisiología animal y celular, la carcinogénesis química, etc.

Las aportaciones a la medicina incluyen desde la primera evidencia de que el cáncer se origina como una alteración genética, hasta la detección de alteraciones de los genes ras tanto a nivel de ADN como de la proteína p21-ras, como posible prueba diagnóstica de una neoplasia humana. El tipo de célula que se pudo registrar en una neoplasia humana desde sus orígenes para determinar con toda el rigor científico si ras desencadena la transformación de una célula normal desde el principio, aun cuando las genes ras se activan como consecuencia del proceso maligno estarían tan relacionadas con el cáncer como para seguirlos estudiando tan exhaustivamente como hasta ahora.

Si los oncogenes ras en realidad desencadenan la transformación, sus falta saber con qué grado de certeza se han obtenido resultados que indican una posible cooperatividad entre diferentes oncogenes ras humanos, algo que no se ha reportado con otros oncogenes y que puede replicar eventos críticos en el proceso maligno. Los oncogenes ras se encuentran en todo tipo de neoplasias, en sus diferentes grados de desarrollo, tanto en tumores benignos como en metastásicos; por otro lado existen numerosos reportes de muestras de neoplasias humanas cuyas células carecen de un alelo de uno de los genes ras, o que presentan un alelo mutante, o aun más de dos alelos por célula, ya sea del alelo normal o de un alelo mutante. Estos resultados sugieren que es posible que un evento determinante para iniciar una transformación sea la proporción entre alelos ya sea entre el alelo normal y un mutante o una concentración crítica de alelos, normales o mutantes, puede ser lo que en un momento dado, escape a los mecanismos celulares de control y de inicio a la carcinogénesis.

En el campo de la biología molecular se han obtenido resultados importantes al estudiar los mecanismos de activación e inactivación de los diferentes genes ras. Su estructura genética que incluye una región 5' que funciona como promotor fuerte o enhancer y las características de su región promotora, que indican que los genes ras son muy necesarios e importantes para las células, solo falta definir el porque son tan importantes.

En el estudio de la evolución, es significativo el que a pesar de que casi no se han realizado investigaciones para detectar la existencia de genes ras, o genes relacionados con ras en otros

organismos. La gran variedad de los genes ras de los mamíferos que se obtienen trae en mayor diversidad de especies. Seguramente en el futuro los resultados trascendentales se realizarán estudios dirigidos exclusivamente a la detección de genes ras en una selección de especies que cubrieron un espectro de diversidad, para determinar que tanto se conservan los genes ras en una amplia de tipo filogenético, y que modificaciones se registran.

Las proteínas codificadas por los genes ras, que en general se denominan p21, han sido muy estudiadas y el resultado han sido importantes aportaciones para la bioquímica, pues estas proteínas p21 son de las relativamente pocas proteínas con afinidad por nucleótidos de guanina que se conocen, sobre lo que se ha hecho algunas investigaciones, además entre las proteínas oncogénicas, p21 ha sido la primera proteína cuya estructura tridimensional se ha descrito; hasta ahora se ha reportado la estructura de p21 unida a GTP, pero es de esperar que próximamente se reporte la estructura tridimensional de p21 con las mutaciones activadas, y de p21 unida a GTP.

Respecto a la función específica de p21 en el metabolismo celular, es algo que se ha investigado exhaustivamente y ha generado una gran cantidad de reportes sin que hasta el momento se haya logrado definir; se considera la posibilidad de que p21 de mamíferos participara en la vía de la adenil ciclasa, lo cual prácticamente se ha descartado; también se ha considerado la posibilidad de que participe en la vía del metabolismo de los inositol fosfolípidos, que sigue investigándose con resultados muy confusos probablemente debido a que las diferentes proteínas p21, codificadas por cada uno de los 3 genes ras de mamíferos, tienen funciones diferentes dentro de esta vía además algunas p21 tal vez participen en la misma y otras no, e incluso las proteínas proto- y oncogénicas podrían presentar diferencias; es posible que las diferencias entre las proteínas p21 normales y transformadas sean más cuantitativas que cualitativas, pues la función de p21 normal responde a la hidrólisis del GTP como mecanismo de regulación, que p21 oncogénica.

La función de p21 en los células de mamíferos se requiere para la estimulación con suero de la síntesis de ADN, y en los ovocitos de *M. lagvis*, las proteínas ras se requieren para la maduración dependiente de insulina. Esto señala que la función de las proteínas ras, no es afectada por estos estímulos, pero puede ser necesaria para su manifestación o bien la otra alternativa es que la función de las proteínas ras puede activarse como una respuesta directa a estos estímulos; en favor de esta última posibilidad están los estudios en los que las proteínas ras oncogénicas, inducen en cada caso, efectos similares al estímulo en sí, lo que hace surgir la posibilidad de que la insulina, el suero u otros factores de crecimiento, e incluso ciertas proteínas oncogénicas que funcionan como tirosina-cinasas, ejerzan una función previa a la función de las proteínas ras, cuya activación sería entonces necesaria para que se induzcan los efectos de dichos estímulos.

En cuando a las investigaciones hechas en el genoma de levaduras *S. cerevisiae*, se sabe que las proteínas de sus genes ras, participan en la adenil ciclasa, aunque no se ha establecido esta

participación sin embargo, es evidente que una proteína ras tan bien cuando otras funciones, cuando que la disrupción de los dos genes ras resulta letal. Evidencia que la disrupción de la normal cicloso no lo es. Los dos protolinas RAS1 y RAS2 parecen tener dife-rentes funciones, y tal vez estas reguladas por distintas señales, o por una sola señal, pero interactúan con distintas proteínas efectoras.

Uno de los últimos descubrimientos trascendentales en el estudio de los genes ras, ha sido la detección de una proteína que interacciona con las proteínas ras llamada GAP. Las proteínas ras tienen una actividad de GTPasa intrínseca, pero que no parece ser suficiente para mantener la proteína unida continuamente a GTP, y al parecer tal insuficiencia se resuelve con la proteína GAP, que cataliza la conversión de p21 unida a GTP a p21 unida a GDP; pero GAP no tiene el mismo efecto en p21 con mutación del codón 12, 59 o 61, por lo que p21 con tales mutaciones, permanece unida a GTP, además de que estas mutaciones tienen una actividad de GTPasa menor que p21 normal. La actividad de GTPasa de p21 parece no estar re-lacionada directamente con su oncogenicidad, pues p21 con mayor o menor capacidad de hidrolisar el GTP puede seguir siendo oncogénica tal vez sea en este punto donde interviene GAP, que podría te-ner una función regulatoria en la hidrolisis del GTP unido a p21, manteniendo un cierto nivel de p21 unida a GTP, que si no regular se daría inicio a la malignidad. Si GAP es una proteína efectora de p21 la vía que se seguiría en la célula iniciaría con la llega-da de alguna señal que induzca la unión de p21 con GTP, luego p21 actuaría sobre GAP, la cual cataliza la hidrolisis del GTP quedando nuevamente p21 unida a GDP. Las proteínas mutantes se unen a GAP pero no responden a su acción catalítica, por lo que continúan unidas a GTP, tal vez induciendo alguna alteración continua, que finalmente lleva a la transformación celular. Aún faltan muchos detalles que especificar en este modelo, incluso no se ha de-mostrado de manera concluyente que la interacción GAP-p21 sea un mecanismo de regulación de la función de p21, que aun se desconoce, pero seguramente no está muy lejos el día que se describa con precisión la función de las proteínas ras, y con ello se determi-nen los pasos de la carcinogénesis, para llegar finalmente al tra-tamiento y/o prevención del cáncer.