

# Biomedicina molecular, oncogenes y cáncer humano

PATRICIO GARIGLIO VIDAL\*

## *Biomedicine Molecular, Oncogenes and Human Cancer*

**Abstract.** *This article offers a general introduction to the role played by molecular biology as applied to medical research, in our understanding of cancer. In particular, I review recent work carried out by my research group, as well as by other groups around the world, bearing on the relationship between the alterations in certain cellular genes and the phenomenon of cancer, and the role played by certain viruses in the development of human cancers.*

### I. Biomedicina molecular

La biomedicina molecular, que emplea las herramientas de la biología molecular, es una nueva interdisciplina bien establecida, cada vez más necesaria para la solución de problemas médicos de interés actual.

En este momento, las diversas áreas de la medicina avanzan apoyadas en los logros obtenidos en la biomedicina molecular, puesto que esta disciplina ayuda a entender, diagnosticar y tratar enfermedades tan distintas como las cardiovasculares, hepáticas, renales, hereditarias, etcétera. El cáncer en general y las neoplasias genitales en particular, no escapan a las bondades y esperanzas que ofrecen la biología molecular y la ingeniería genética, tanto a pacientes como a médicos.

En México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte de la población en general y representa un serio problema de salud; el cáncer cervicouterino (CaCu) en mujeres y las leucemias en niños y jóvenes son frecuentes. Con base en lo anterior, resulta importante tratar de entender las bases moleculares de esta enfermedad, diseñar sondas para el diagnóstico y elaborar estrategias para su prevención y terapia.

Los avances de la biología molecular y de la ingeniería genética permiten el aislamiento y caracterización funcional de oncogenes y antioncogenes, los cuales están involucrados en el desarrollo de las distintas neoplasias. También los avances de la virología molecular han ayudado a entender cánceres, tales como el CaCu, en los que intervienen virus tumorales. De esta forma, los descubrimientos recientes en el campo de la biomedicina molecular, y en particular de la oncología molecular, han permitido que médicos, clínicos, virólogos, bioquímicos y biólogos de todo tipo se integren y hablen un lenguaje común respecto al cáncer humano.

Nuestro laboratorio ha trabajado con virus tumorales y con la estructura y expresión de oncogenes, tanto virales como celulares. Estos estudios nos han llevado al desarrollo de métodos preventivos y de diagnóstico molecular. Asimismo, hemos tratado de entender algunas de las propiedades de los antioncogenes (genes supresores de tumores) y de sus respectivas proteínas antioncogénicas. En lo siguiente se explicarán brevemente las bases de estos estudios y los logros alcanzados hasta el momento.

### II. Virus tumorales como modelo de cáncer

El material genético de una célula de mamífero es complejo y posee más de 100 mil genes; sin embargo, el Virus del Simio 40 (SV40) es un excelente modelo para estudiar transcripción, replica-

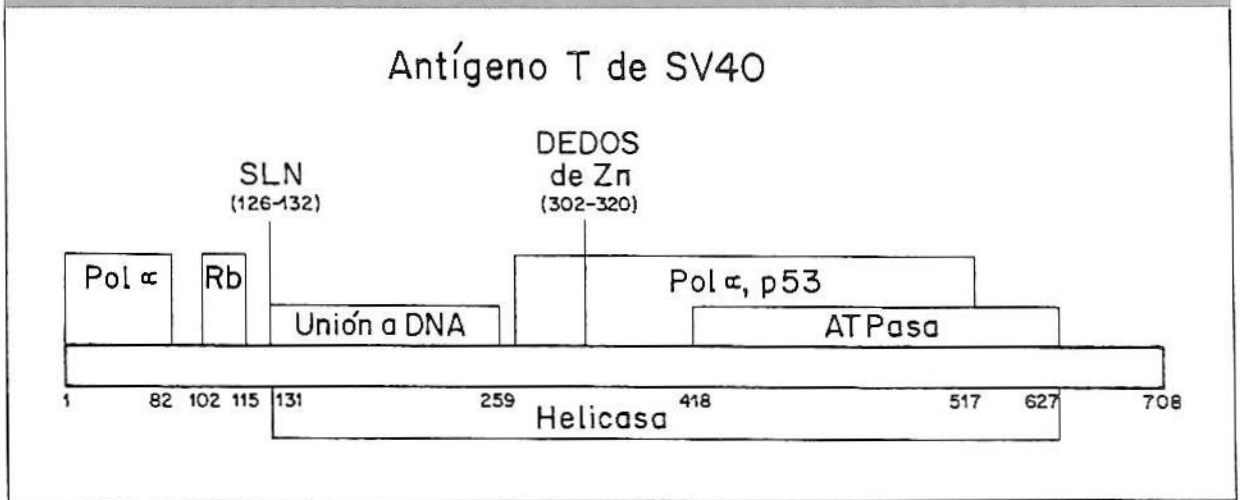
\* Investigador del CINVESTAV-IPN.

E-mail: vidal@lambda.gene.cinvestav.mx

Agradezco al CONACYT, PNUD, UNIDO, su apoyo para llevar a cabo el trabajo de nuestro laboratorio, así como a la "Asociación Lic. Aarón Saenz G." y la ayuda secretarial de Verónica Ramírez.



FIGURA 1. ANTÍGENO T GRANDE: PROTEÍNA ONCOGÉNICA DE 708 AMINOÁCIDOS, CODIFICADA POR SV40. ESTA PROTEÍNA SE UNE AL DNA EN EL ORIGEN DE REPLICACIÓN DE SV40 Y SE ASOCIA A VARIAS PROTEÍNAS CELULARES, ENTRE LAS QUE DESTACAN LA DNA POLIMERASA (A LA QUE ACTIVA) Y LAS PROTEÍNAS ANTI-ONCOGÉNICAS P<sub>RB</sub> Y P<sub>53</sub> (A LAS QUE INHIBE).



ción y transformación en células eucarióticas, esto se debe a que posee un pequeño genoma que codifica sólo cinco proteínas y, por lo

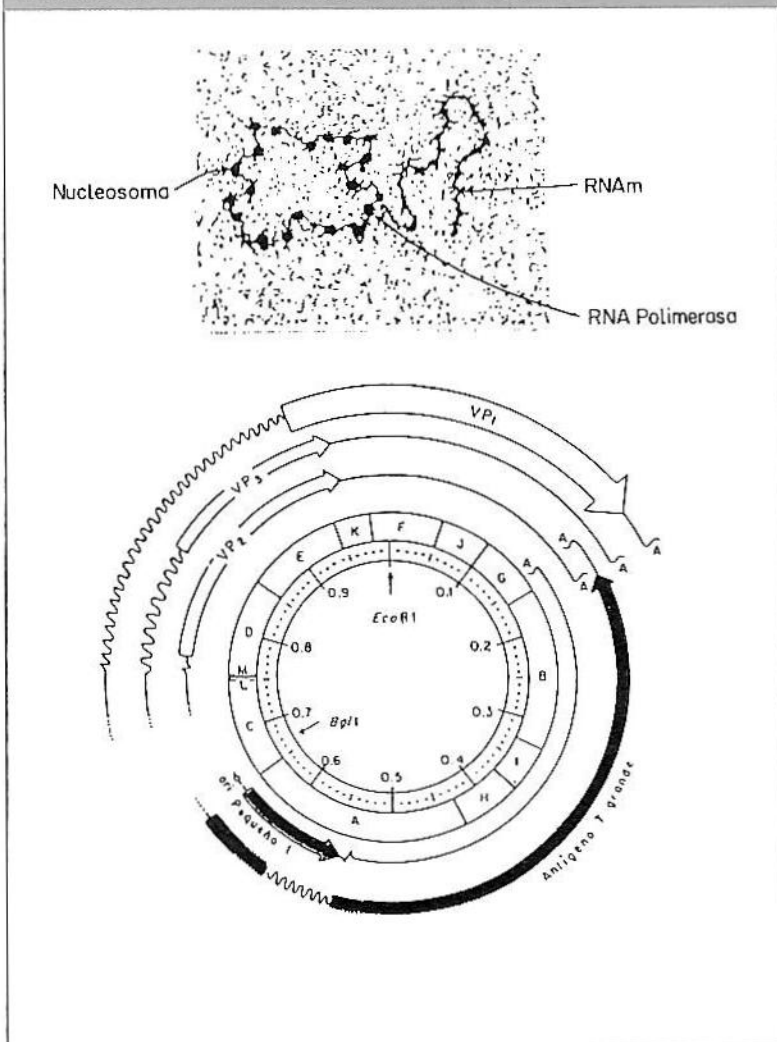
tanto, debe usar toda la maquinaria enzimática celular para transcribirse y replicarse.

La proteína más importante codificada por SV40 es el antígeno T, responsable de varias actividades: estimula la proliferación celular, induce síntesis de ADN en células en reposo, immortaliza células primarias, transforma células e induce tumores en animales (figura 1). El antígeno T es fundamental en la replicación viral porque se une a la ADN polimerasa-primasa y a otras proteínas celulares importantes, tales como los productos de los genes supresores de tumores *p53* y retinoblastoma. También regula la transcripción de genes celulares y virales.

El SV40, además de poseer un reducido genoma, durante la infección lítica de una célula produce medio millón de copias prácticamente idénticas (minicromosomas de SV40). Descubrimos que sólo 1% de los minicromosomas es activo en transcripción y demostramos, en forma paralela, que estos genomas virales activos tienen la misma estructura que el resto de la cromatina viral o celular (Gariglio *et al.*, 1979); es decir, contrario a lo que se pensaba, las histonas no son inhibidores transcripcionales y pueden compactar en una estructura nucleosomal a genes transcripcionalmente activos (figura 2).

El Dr. Alejandro García Carrancá (profesor del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM), durante su trabajo de maestría en nuestro laboratorio usó el modelo de SV40 para determinar que la subespecie altamente fosforilada de la ARN polimerasa II es la que transcribe ARN mensajero (García *et al.*, 1986). Respecto a esto, es necesario mencionar que existen tres sub-

FIGURA 2. EN LA PARTE SUPERIOR SE MUESTRA UN MINICROMOSOMA DE SV40 ACTIVO EN TRANSCRIPCIÓN. ABAJO SE INDICAN LOS TRANSCRITOS TARDÍOS QUE CODIFICAN PARA LAS PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE SV40 (VP1, VP2, VP3) Y LOS TRANSCRITOS TEMPRANOS QUE SIRVEN PARA LA SÍNTESIS DE LOS ANTÍGENOS T PEQUEÑO Y T GRANDE.



especies de ARN polimerasa II, conocidas como IIO, IIA y IIB. La diferencia entre éstas reside en el extremo carboxiterminal de la subunidad de mayor peso molecular. Dicho extremo está altamente fosforilado en la subespecie IIO, hipofosforilado en IIA y ausente en IIB. En los minicromosomas de SV40 activos en transcripción, determinamos que la subespecie IIO predomina, aunque existe una pequeña cantidad de ARN polimerasa IIA (*ibid.*). Estos estudios concuerdan con observaciones recientes (Dahmus, 1995) que indican que la sub-especie IIA es la que reconoce la región promotora y la IIO es la que transcribe, es decir, la polimerasa IIA debe fosforilarse para iniciar el alargamiento de las cadenas de ARN (figura 3).

Por otro lado, hemos podido purificar los minicromosomas activos en replicación, los cuales representan 5% del total de los minicromosomas de SV40 (Miranda *et al.*, 1992); esto nos ha permitido el estudio directo de proteínas celulares (antígeno nuclear de proliferación celular, topoisomerasas, ADN polimerasas) y virales (antígeno T) asociadas a los complejos de SV40 activos en replicación.

En paralelo con estos estudios, determinamos<sup>1</sup> que el poliovirus (perteneciente a la familia de los papovavirus, al igual que SV40 y los papilomavirus) usa estrategias para evitar la expresión de genes tardíos y favorecer aquella de sus oncogenes durante la inducción de tumores (Talmage *et al.*, 1992).

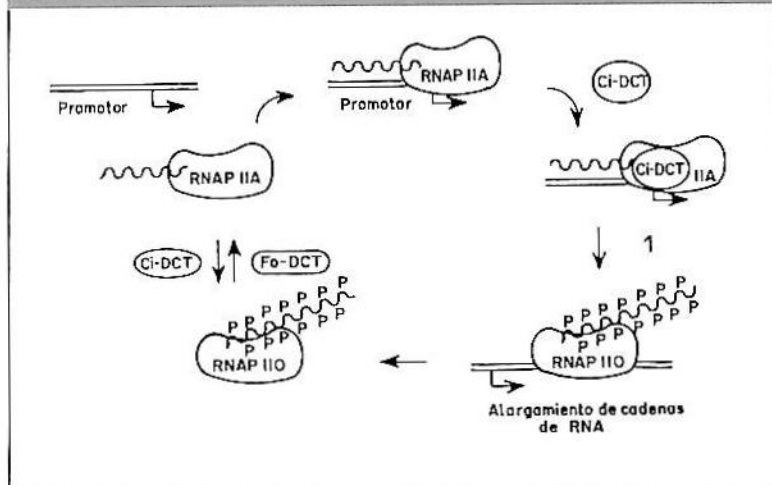
Empleamos diversos mutantes del virus polio para entender el mecanismo molecular por el cual este virus causa cáncer en roedores; en este sentido, nuestro proyecto en colaboración con el Dr. Thomas Benjamin se encamina a entender la cooperación entre los oncogenes virales y celulares en el desarrollo de neoplasias murinas.

### III. Estructura y expresión de protooncogenes y oncogenes

Los conocimientos y tecnología adquiridos en sistemas modelo de cáncer se han aplicado en forma paralela en humanos, con el fin de entender las bases moleculares de esta enfermedad.

El descubrimiento de los protooncogenes (genes normales) y de los oncogenes en la década pasada, ha permitido explicar el cáncer a nivel molecular debido a que los oncogenes representan formas mutadas de genes celulares normales, y ellos indican claramente los blancos genéticos

FIGURA 3. CICLO TRANSCRIPCIONAL DE LA RNA POLIMERASA II, DONDE SE ENFATIZAN LAS ETAPAS DEL CICLO QUE EN PRINCIPIO PODRÍAN SER REGULADAS POR UNA FOSFORILACIÓN REVERSIBLE DEL DOMINIO CARBOXY TERMINAL (DCT). LA FORMA DESFOSFORILADA DE LA RNA POLIMERASA II (RNAP IIA) RECONOCE A LA REGIÓN PROMOTORA, LUEGO EL DCT SE FOSFORILA Y LA FORMA FOSFORILADA DE LA RNA POLIMERASA II (FORMA IIO) PODRÍA TRANSCRIBIR EL GEN, CON LO QUE SE ALARGAN LAS CADENAS DE RNA.



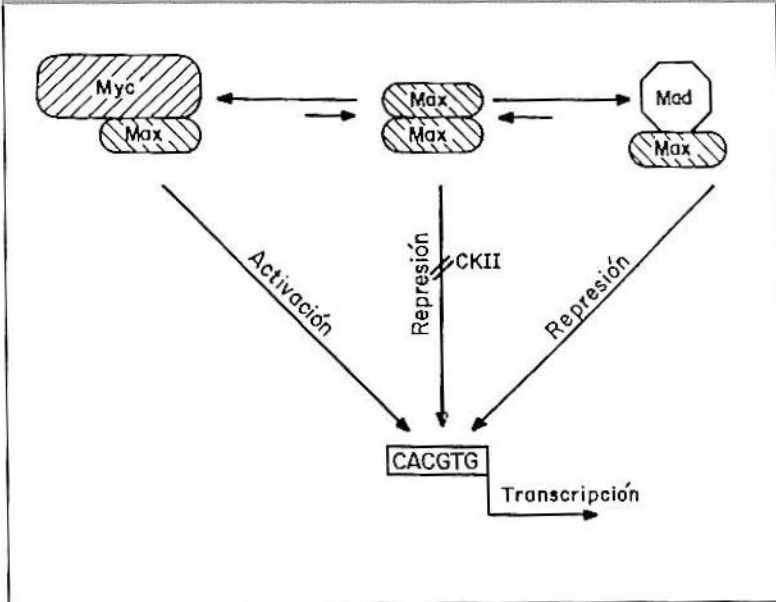
que se alteran por agentes cancerígenos. Cuando los protooncogenes se alteran molecularmente, se transforman en oncogenes activados; entre las alteraciones más frecuentes tenemos: mutación, rearrreglo génico y amplificación. Los protooncogenes desempeñan funciones importantes para el crecimiento celular, debido a que codifican para factores de crecimiento, receptores a dichos factores, transductores de señales y proteínas nucleares que actúan como factores de replicación o de transcripción, al activar genes importantes en el crecimiento normal de la célula. Por ejemplo, la proteína myc se localiza en el núcleo y participa tanto en la replicación del genoma celular como en la regulación de la transcripción genética; la proteína ras se asocia a la membrana citoplasmática y envía señales mitogénicas al interior de la célula, es decir, actúa como transductor de señales; los productos de los protooncogenes *jun* y *fos* también se localizan en el núcleo celular y forman el heterodímero *jun-fos* conocido como AP-1, el cual es un factor de transcripción importante.

Respecto a productos de protooncogenes que actúan como factores de crecimiento, podemos mencionar a la proteína *c-sis*, que es homóloga a la cadena B del factor de crecimiento secretado por las plaquetas (o PDGF por su siglas en inglés). El producto del protooncogen *neu* es un receptor de factores de crecimiento, que posee actividad de cinasa específica de tirosinas. Se ha de-

1. En colaboración con Thomas L. Benjamin (Harvard Medical School, Boston, MA), Mauricio Salcedo y Luz María Rangel.



FIGURA 4. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL CAUSADA POR EL HOMODIMERO MAX-MAX Y EL HETERODIMERO MYC-MAX. LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA MAX NO VARIA EN LAS DISTINTAS ETAPAS DEL CICLO CELULAR Y LOS HOMODÍMEROS MAX-MAX SON INHIBIDORES TRANSCRIPCIONALES. CUANDO ALGÚN FACTOR DE CRECIMIENTO PRODUCE AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE MYC, SE FAVORECE LA FORMACIÓN DEL HETERODIMERO MYC-MAX Y SE ACTIVAN GENES IMPORTANTES EN CRECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN CELULAR.



terminado que una amplificación del gen *neu* (llamado también *c-erb B-2*) en cáncer mamario, se correlaciona con tumores más agresivos.

#### IV. El gen *c-myc*

El gen *c-myc* se encuentra frecuentemente alterado en cáncer humano. Este protooncogen consta de tres exones, separados por dos intrones largos y además posee dos regiones promotoras (P1 y P2) y dos sitios CAP de iniciación de la transcripción. El tamaño de los ARN mensajeros (ARNm), codificados por *c-myc*, es de 2,030 y 2,200 bases, sin tomar en cuenta la región poli-A. Los exones 2 y 3 del ARNm de *myc*, codifican para una proteína de 439 aminoácidos.

Por otra parte, en la región amino terminal de las proteínas *myc* (N-*myc*, c-*myc* y L-*myc*), existen dominios importantes: un dominio de actividad transcripcional (aminoácidos 1 al 143), una región de inhibición de la diferenciación y una región que determina la unión a la proteína codificada por el gen retinoblastoma (proteína Rb), del aminoácido 41 al 178.

Las interacciones entre proteínas oncogénicas (*myc*) y antioncogénicas (pRb) deben tener importancia en el control transcripcional de genes relacionados con la proliferación celular. Nuestro grupo ha determinado, en CaCu, la incidencia de mutaciones en la región de *c-myc*, que define la unión a pRb. La región carboxiterminal presenta una región básica, seguida de una región con estructura helicoidal (del aa 369 al 410) y una cremallera o cierre (zipper) de leucinas (del aa 411 al 439); estas regiones son fundamentales en la unión de la proteína *myc* al ADN y en la dimerización con otra proteína celular. También encontramos que la proteína *myc* forma heterodímeros con la proteína *max*, los cuales se unen a secuencias CACGTG, presente en regiones promotoras; así como que una sobreexpresión de *myc* lleva al cambio de los homodímeros *max-max* a heterodímeros *myc-max*, y cambia una represión génica en una activación (figura 4).

Asimismo, para que *myc* induzca apoptosis (muerte celular programada) requiere de la interacción con *max*. En ese sentido, la proteína *mad* también interactúa con *max*, pero no con *myc*; *mad* y *myc* compiten por la unión a *max*, por lo que el complejo *mad-max* es un represor transcripcional. *Mad* podría ser una proteína antioncogénica, puesto que se opone a la función proliferativa de *myc*.

La expresión de *c-myc* depende de factores de crecimiento y aumenta con la entrada de las células al ciclo celular, lo que sugiere que la expresión de este gen puede ser un componente de la proliferación celular normal. Se ha visto que la proteína *myc* participa en la replicación del ADN y en la transcripción de genes que controlan el crecimiento celular. Además, recientemente se ha determinado que *c-myc* induce apoptosis en fibroblastos derivados de suero o en otras células que están bloqueadas en proliferación por drogas o citosinas antiproliferativas.

Hace varios años determinamos que los oncogenes celulares (por ejemplo, *c-myc*) juegan un papel importante en el desarrollo de CaCu (Gariglio *et al.*, 1987 y Ocadiz *et al.*, 1987). En aproximadamente 80% de los tumores cervicales invasores, el gen *c-myc* está amplificado y/o rearrreglado; sin embargo, estas alteraciones comienzan en etapas preinvasoras del cáncer de cérvix. Es posible que en algunos tumores cervicales las alteraciones observadas en nuestro laboratorio tengan algo que ver con una disminución de apoptosis y, por lo tanto, con el desarrollo del tumor.<sup>2</sup>

2. Varios investigadores de nuestro grupo estudian la estructura y expresión de oncogenes y antioncogenes, en tumores cervicales y en líneas celulares derivadas de ellos, obtenidas en el laboratorio del doctor Beny Weiss (ENEP, Zaragoza).

V. El gen *ras*

Otro oncogen muy importante en el desarrollo del cáncer humano es *ras*. La familia de genes *ras* está formada por tres muy relacionados: *Ha-ras*, *Ki-ras* y *N-ras*, los cuales se han caracterizado como potencialmente transformadores que codifican proteínas p21 *ras* (de 189 aa). Estos tres adquieren el potencial transformante cuando, a causa de una mutación puntual, se altera un aminoácido de la proteína en una posición crítica (aa 12, 13, 59, 61 o 63). En muchos tumores humanos y líneas celulares derivadas de ellos, se han encontrado genes *ras* activados que presentan mutaciones frecuentes en la posición 12 de p21 *ras* (tabla 1). Desde hace varios años se sabe que *ras* actúa como transductor de señales del exterior al interior de la célula. La activación de receptores con actividad de tirosina cinasa —tales como aquellos para el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), la insulina o el factor de crecimiento neural (NGF)—, transforma el complejo inactivo de GDP-*ras* en el complejo activo GTP-*ras* (figura 5). Esta activación es precedida de la autofosforilación del receptor y de la asociación del receptor fosforilado con proteínas del citoplasma (proteína adaptadora Grb2 y el factor de intercambio de nucleótidos Sos). Estos datos definen una vía por la cual algunas tirosina cinasas actúan a través de *ras*, para controlar el crecimiento y la diferenciación celular, y probablemente llevarán a entender mejor la transformación neoplásica. Los descubrimientos relacionados con oncogenes celulares (por ejemplo *neu*, *myc* y *ras*) permitirán, además, el desarrollo de formas nuevas y racionales de tratamiento del cáncer humano.

VI. Presencia de papilomavirus humano (PVH) y expresión de oncogenes virales

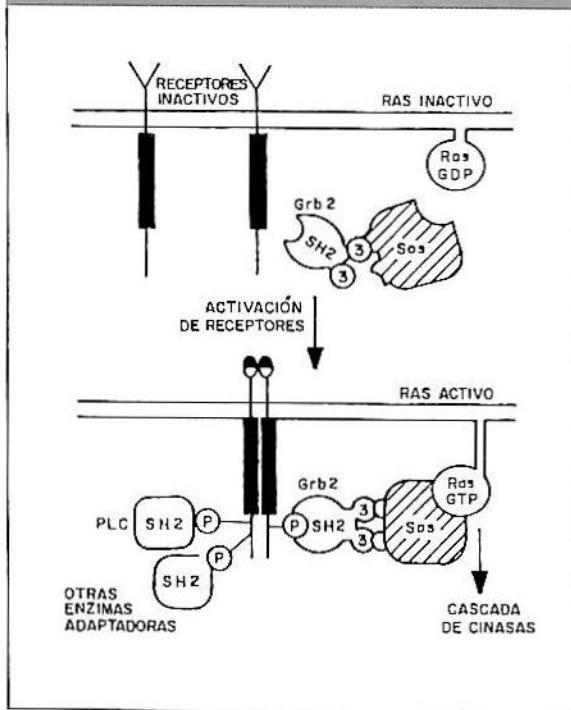
Algunos virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos al usar diferentes mecanismos que van desde la estimulación de la proliferación celular hasta la inmunosupresión (Gariglio y Rangel, 1992). El virus del Epstein-Barr, de la hepatitis B, varios tipos de PVH y el virus de la leucemia humana de células T, se asocian consistentemente a cánceres específicos; sin embargo, la infección con estos virus no es suficiente para inducir neoplasia. Los periodos largos de latencia (varias décadas) entre la infección y el desarrollo

TABLA 1				
MUTACIONES QUE ACTIVAN RAS EN TUMORES HUMANOS				
ONCOGEN	ORIGEN	CODON AFECTADO	CAMBIO DE BASE	CAMBIO DE AA
<i>HA-RAS</i>	CÁNCER DE VEJIGA	12	G-T	GLY-VAL
	CÁNCER MAMARIO	12	G-A	GLY-ASP
	CÁNCER DE PULMÓN	61	A-T	GLN-LEU
<i>N-RAS</i>	NEUROBLASTOMA	61	C-A	GLN-LYS
	CÁNCER DE PULMÓN	61	A-G	GLN-ARG
<i>KI-RAS</i>	CÁNCER DE PULMÓN	12	G-T	GLY-CYS
	CÁNCER DE COLON	12	G-T	GLY-VAL

de un carcinoma, así como el bajo número de individuos infectados que desarrollan cáncer, sugieren que se necesitan otros factores para que se origine un tumor maligno después de la infección viral.

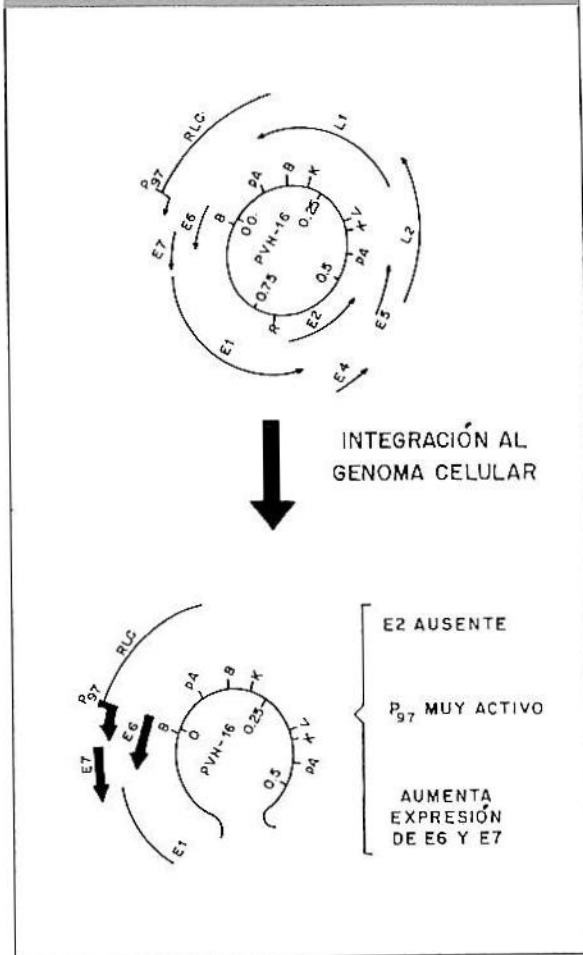
Algunos tipos de PVH son considerados como factores de riesgo en cáncer genital. Con base en su asociación con CaCu, los PVH genitales se pueden clasificar en grupos de bajo riesgo (tipos 6 y 11), riesgo intermedio (31, 33 y 35) o alto riesgo (16 y 18). Los PVH tienen ADN de cadena doble, circular y formado por alrededor de 7,900 pares de bases; su genoma es organizado de una forma

FIGURA 5. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES PROVENIENTES DE RECEPTORES A FACTORES DE CRECIMIENTO, MEDIADA POR LA PROTEÍNA PROTOONCOGÉNICA RAS. LA ACTIVACIÓN DE DICHO RECEPTORES LLEVA A SU AUTOFOSFORILACIÓN, LO CUAL PERMITE LA ASOCIACIÓN DE LAS PROTEÍNAS GRB2 Y SOS, Y LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO GTP-RAS ACTIVADO. MEDIANTE UNA CASCADA DE CINASAS SE TRANSMITEN SEÑALES AL NÚCLEO CELULAR, DONDE SE ACTIVAN GENES NECESARIOS EN EL CRECIMIENTO Y PROLIFERACIÓN DE LA CÉLULA.



similar, con genes de expresión temprana (E) y otros de expresión tardía (L) (figura 6), codificados por la misma cadena de DNA (es decir, transcritos en un solo sentido). La región que precede a los genes tempranos se llama región larga de control (RLC o LCR) y contiene secuencias promotoras y aumentadoras de la transcripción, así como secuencias que controlan el inicio de la

**FIGURA 6. MAPA GENÉTICO DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO TIPO 16 (HPV 16). SU GENOMA CONTIENE APROXIMADAMENTE 8KB, DOBLE CADENA, PERO CONTIENE TODA LA INFORMACIÓN GENÉTICA EN UNA CADENA, Y ESTÁ DIVIDIDO EN GENES TEMPRANOS (E), TARDÍOS (L) Y UNA REGIÓN LARGA DE CONTROL (LCR). PA, SEÑAL DE POLIADENILACIÓN; B, BAM HI; R, ECO RI; K, KPN; V, ECO RV SON SITIOS DE RESTRICCIÓN DE HPV16. P97 ES EL PROMOTOR TEMPRANO. SE INDICA LA INTERRUPCIÓN DEL GENOMA VIRAL AL INTEGRARSE AL GENOMA CELULAR, CON EL CONSIGUIENTE BLOQUEO EN LA SÍNTESIS DE LA PROTEÍNA E2 (TRANSREGULADOR NEGATIVO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 DE LOS HPV GENITALES).**



replicación. La región temprana codifica para proteínas que se necesitan en la replicación del genoma viral (E1, E2) y una proteína (E2) que puede actuar como activador o represor de la transcripción de los oncogenes virales (E6, E7).

Entre las evidencias de que algunos PVH están involucrados causalmente en CaCu, tenemos: 1) el ADN viral se encuentra entre 80 y 90% de dichos tumores; 2) el ADN de PVH se integra al genoma celular, con la consecuente inactivación del gen E2 que favorece la expresión de los oncogenes virales E6 y E7; 3) en tumores y líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales, se encuentra ARNm y proteína de los oncogenes E6, E7; 4) se ha demostrado que E6 y E7 (provenientes de los PVH 16 o 18) son capaces de immortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos y de transformarlos en cooperación con el oncogen *ras* activado. Además, al cultivar durante largos tiempos las células immortalizadas por E6 y E7, éstas dan origen a clonas malignas, lo que sugiere que un gen celular (posiblemente *myc* o *ras*, o tal vez *p53*) se modifica en dichos cultivos.

En cuanto a la integración del genoma viral al ADN celular, cuando la lesión progresa de precancerosa a cancerosa, vale la pena destacar que la integración en el genoma celular es al azar, aunque en algunos casos nuestro grupo ha encontrado que ocurre dentro o muy cerca del gen *c-myc*, lo cual sugiere que tanto PVH como oncogenes celulares activados (*c-myc*) participan en CaCu (Gariglio *et al.*, 1987 y Ocadiz *et al.*, 1987); por otra parte, el ADN viral se rompe en la región E1-E2, con lo cual se inhibe la síntesis de la proteína E2 y se estimula la expresión de los oncogenes virales.

En un trabajo reciente<sup>3</sup> encontramos que esta proteína actúa como inhibidor de la transcripción de los oncogenes virales de los PVH genitales de alto riesgo, pero activa aquella de los papilomavirus cutáneos (Guido *et al.*, 1992). Es decir, la integración del genoma viral con la consecuente inhibición de la expresión de E2, favorece la expresión de los oncogenes de PVH genitales y por consiguiente el desarrollo de un carcinoma. En este estudio nos dimos cuenta que la distancia entre la caja TATA y el sitio de unión proximal de la proteína E2 al ADN juega un papel importante en la inhibición de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7. Al usar técnicas de ingeniería genética, hemos terminado un estudio sobre el mecanismo fino de interacción entre E2 y TFIID (factor transcripcional que se une a la caja TATA). Con base en lo anterior, podemos concluir que la integración del genoma viral al DNA celular es un paso importante del desarrollo de CaCu, y se apoya así la hipótesis del desarrollo del cáncer en etapas múltiples.

3. Con la participación del doctor Efraín Garrido y Rocío Zamorano, y en colaboración con el grupo del doctor Alejandro García C.



Nuestro grupo<sup>4</sup> ha analizado (mediante mutagénesis dirigida, retardamiento de oligonucleótidos y ensayos de actividad CAT) la importancia de los sitios NF-1 presentes en la región LCR de los PVH, sobre la expresión de los oncogenes virales.

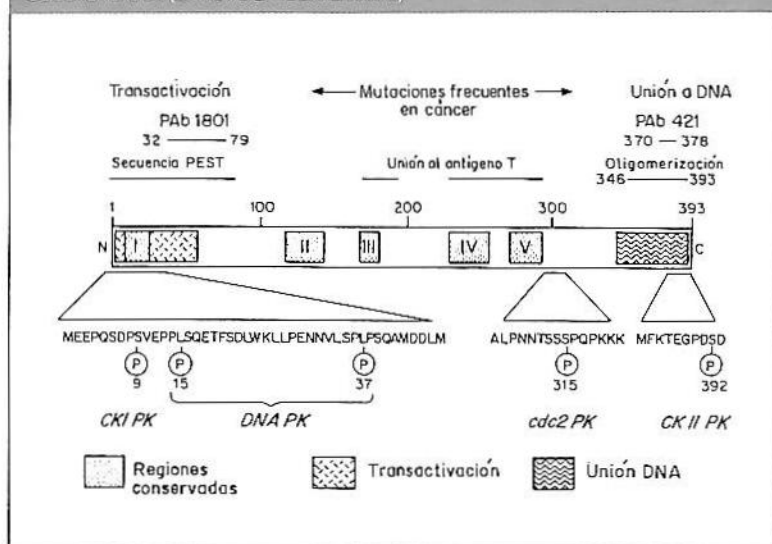
### VII. Participación de antioncogenes en cáncer humano

Cuando se fusionan células normales y tumorales, frecuentemente la célula híbrida pierde el carácter tumoral, e indica que a la célula neoplásica le falta un gen regulador negativo del crecimiento y que es posible recuperar dicho control al fusionarla con una célula normal. Estos genes de regulación negativa del crecimiento se llaman genes supresores de tumor o antioncogenes, uno de los más estudiados es el gen retinoblastoma (*Rb*). La pérdida o inactivación de *Rb* predispone al desarrollo de retinoblastomas y osteosarcomas.

La proteína retinoblastoma (p105-Rb) es uno de los blancos celulares de proteínas oncogénicas virales. Así, se han encontrado complejos formados entre p105-Rb y el antígeno T grande de SV40, o bien, entre p105-Rb y el producto del oncogen E7 de los PVH tipo 16 o tipo 18. En todos los casos, las oncoproteínas virales inactivan a p105-Rb, lo cual favorece el crecimiento descontrolado de las células. La interacción de proteínas oncogénicas virales con una proteína celular común, sugirió la existencia de un complejo entre myc y p105-Rb, el cual se reportó recientemente (ver apartado IV).

Otro antioncogen importante es *p53*. Estudios epidemiológicos han indicado que entre 50 y 60% de los tumores malignos poseen mutaciones en *p53*, es decir, éste es el gen que se encuentra más frecuentemente mutado en cáncer humano (Hollstein *et al.*, 1991) (figura 7). Las mutaciones en el gen *p53* se reflejan en una proteína con vida media larga; después de su síntesis, la proteína *p53* mutada no se degrada rápidamente, como ocurre con *p53* silvestre y se acumula en las células. La proteína *p53* mutada inactiva a la *p53* silvestre, al formar complejos multiméricos con ella. Al parecer, la forma fosforilada de *p53* es la que inhibe el ciclo celular (figura 8), es decir, la que detiene el crecimiento de la célula (forma antioncogénica); esta modificación postranscripcional ocurre en la fase G1 del ciclo celular y está mediada por la cinasa *p34 cdc2* (Ullrich *et al.*, 1992a y 1992b).

FIGURA 7. SE MUESTRAN ALGUNAS CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE LA PROTEÍNA P53 HUMANA. EN PARTICULAR SE RESALTAN LAS REGIONES CONSERVADAS: LA DE TRANSACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL (EXTREMO AMINOTERMINAL), LA DE UNIÓN AL DNA Y DE OLIGOMERIZACIÓN (EXTREMO CARBOXITERMINAL).



La proteína oncogénica E6 de los PVH de alto riesgo forma un complejo con p53 y destruye rápidamente a esta proteína antioncogénica (Scheffner *et al.*, 1990); es posible que el efecto oncogénico de los PVH resulte, en parte, de este tipo de interacciones. Al parecer las funciones normales de p53 y pRb se bloquean durante el desarrollo del CaCu, ya sea por mutaciones en dichos antioncogenes o por interacción de las proteínas antioncogénicas con las proteínas E6 y E7 de los PVH de alto riesgo, respectivamente.<sup>5</sup>

### VIII. Carcinogénesis en etapas múltiples

Estudios con virus tumorales indican que los oncogenes participan en las diferentes etapas del desarrollo de un tumor maligno; algunos de estos virus poseen dos oncogenes que cooperan para inducir un fenotipo completamente tumorigénico. Hemos visto que los PVH poseen dos oncogenes

4. En colaboración con F. Thierry y M. Yaniv del Instituto Pasteur de París y con la participación de la doctora Esther López B.
5. En colaboración con los doctores Joseph DiPaolo (NIH, Bethesda, MD), Luis Álvarez S. y la maestra Araceli Velázquez, terminamos un estudio sobre la regulación transcripcional negativa de los oncogenes E6 y E7 de PVH por p53. En un estudio similar, con la participación de Efraim Garrido, encontramos que la región de PVH posee un sitio E2F (factor de transcripción) y que pRb es capaz de bloquear dicha región al inhibir la expresión de los oncogenes virales. Es conocido que pRb puede unirse e inactivar el factor E2F; por lo tanto, planteamos que Rb inhibe la expresión de los oncogenes E6 y E7 de PVH por la inactivación de E2F.

y que las proteínas oncogénicas virales inactivan a proteínas antioncogénicas celulares, lo que sugiere que cada oncogen se especializa para inducir una parte del fenotipo requerido en la transformación maligna total. Este concepto fue extendido a un buen número de los oncogenes de origen celular. Así, ni los oncogénes *ras* o *myc*, por separado, son capaces de inducir una transformación completa, en tanto que los dos oncogenes juntos pueden alcanzar dicho resultado (figura 9). El descubrimiento de la colaboración entre oncogenes, ayuda a entender el mecanismo de la carcinogénesis en etapas múltiples.

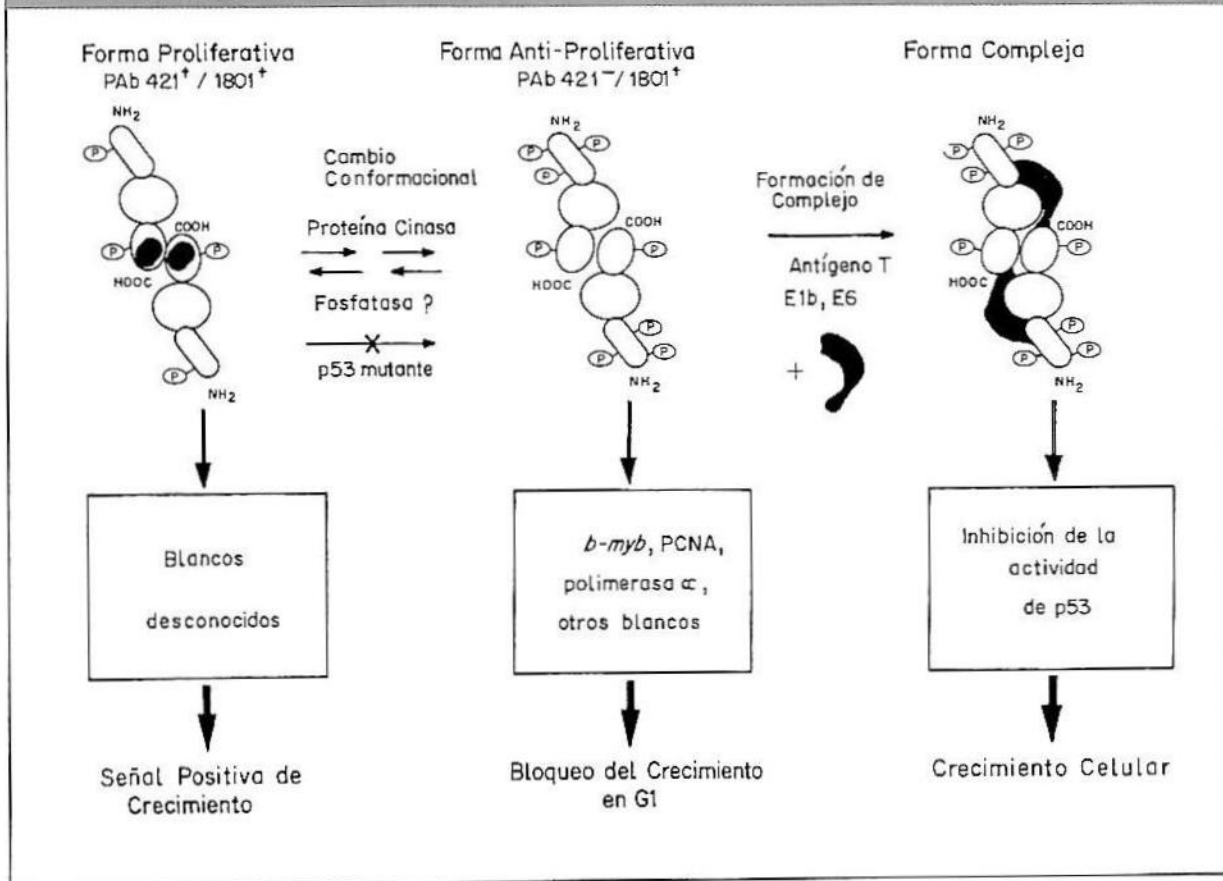
Con base en lo anterior, debemos pensar que cada paso en el proceso de tumorigénesis refleja una mutación que lleva a la activación de uno u otro oncogen celular. Por lo tanto, pretendemos determinar el mecanismo por el que los oncogenes virales (E6 y E7 de los papilomavirus humanos) cooperan con el oncogen *ras* para transformar cultivos celulares primarios de queratinocitos; también estudiamos la participación de *myc* y *ras* en el desarrollo del CaCu. Es posible que en humanos deban alterarse 5 o 6 genes durante el desarrollo de un tumor maligno. Además de onco-

genes y antioncogenes, durante el desarrollo de un tumor se alteran varios genes involucrados en el temible proceso de metástasis, pero el cáncer no sería un enemigo tan potente si pudiésemos controlar la metástasis, es decir, la migración de células tumorales al sistema linfático y sanguíneo, que frecuentemente origina tumores en distintos lugares del organismo. Esto constituye el principal problema clínico en cáncer, pues la remoción del tumor primario es, en la mayoría de los casos, perfectamente factible. Junto con los doctores Mauricio Salcedo y Luis Benítez Bribiesca, se estudia el papel que el gen *nm23* puede tener en metástasis, originada de un CaCu. El producto de este gen se ha relacionado con la supresión de metástasis en varios carcinomas (por ejemplo en cáncer mamario).

**IX. Diagnóstico molecular y vacunas en cáncer**

El diagnóstico de las alteraciones genéticas (oncogenes, antioncogenes y genes involucrados en la metástasis) es de gran importancia clínica y permite un pronóstico acertado y el diseño de nuevos métodos terapéuticos en cáncer humano.

**FIGURA 8. REGULACIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR POR LA PROTEÍNA p53. LA FORMA PROLIFERATIVA DE p53 ESTÁ HIPOFOSFORILADA Y ES RECONOCIDA POR LOS ANTICUERPOS 421 Y 1801. LA FORMA INHIBIDORA DEL CRECIMIENTO ESTÁ HIPERFOSFORILADA Y NO ES RECONOCIDA POR EL ANTICUERPO 421. VARIAS PROTEÍNAS ONCOGÉNICAS VIRALES (COMO LA PROTEÍNA E6 DE LOS PVH GENITALES DE ALTO RIESGO) SE UNEN Y DESTRUYEN RÁPIDAMENTE LA ACTIVIDAD ANTIONCOGÉNICA DE p53, CON LO CUAL LA CÉLULA INFECTADA PUEDE PERDER EL CONTROL NEGATIVO DEL CRECIMIENTO.**





Por ejemplo, es sabido que las células leucémicas que expresan oncoproteínas híbridas, tales como E2A-PbX1 o bcr-abl, son de muy mal pronóstico. Afortunadamente, las alteraciones moleculares de estas leucemias son específicas y es posible usar técnicas moleculares relativamente simples para detectar genes híbridos o sus productos aberrantes. Esto permite un diagnóstico temprano y un tratamiento apropiado en subtipos agresivos de la enfermedad.

Con la participación de Enrique Miranda y Mario Gutiérrez (doctores del Hospital General de México) hemos detectado, mediante el uso de la tecnología de PCR, alteraciones frecuentes del tipo E2A-pBX1 y del tipo bcr-abl en niños leucémicos; estas alteraciones no siempre corresponden con la translocación cromosómica esperada. Por ejemplo, el rearreglo E2A-PbX1 se ha observado incluso en ausencia de la translocación t(1; 19)(q23; p13), que afecta el brazo largo del cromosoma (en q23) y el brazo corto del cromosoma 19 (en p13); o bien el rearreglo bcr-abl (figura 10) que se observa algunas veces en ausencia de t(9; 22)(q34; q11). Debido a que los métodos moleculares son más sensibles y precisos que los citogenéticos, es indudable que nos encontramos en el inicio de una nueva era en el diagnóstico de las leucemias.

Respecto a la detección de PVH y el diagnóstico de tipo viral en lesiones premalignas y malignas del cérvix, hemos realizado varios estudios de epidemiología molecular, tanto en la ciudad de México como en Monterrey (Gariglio *et al.*, 1987 y González *et al.*, 1992). El estudio más reciente<sup>6</sup> de este tipo involucra poblaciones con bajo y alto riesgo de cáncer cervical.

Dado el componente viral en CaCu, no parece lejano el momento de desarrollar una vacuna. Respecto a esta posibilidad, es necesario recordar que el sistema inmune es capaz de reconocer y reaccionar contra las células cancerosas. Cuando una célula normal se transforma en cancerosa, frecuentemente esta reacción es inespecífica y está mediada por células NK. Sin embargo, cuando una célula normal se transforma en cancerosa, ella expone en su superficie marcadores alterados que son reconocidos por el sistema inmune como extraños al organismo. Es necesario tener en cuenta que algunos cánceres que se presentan en individuos inmunodeficientes son aquellos que se asocian con virus tumorales, y sugieren que una respuesta inmune normal es de particular importan-

FIGURA 9. LA TRANSFORMACIÓN CELULAR REQUIERE DE LA COOPERACIÓN DE AL MENOS DOS ONCOGENES ACTIVADOS DE DIFERENTE FAMILIA (UNO NUCLEAR, REPRESENTADO POR MYC, Y UNO CITOPLASMÁTICO, REPRESENTADO POR RAS). EN EL CASO DEL CaCu PUEDEN PARTICIPAR ONCOGENES Y ANTIONCOGENES CELULARES, QUE COOPERAN CON LOS PRODUCTOS DE ONCOGENES VIRALES.

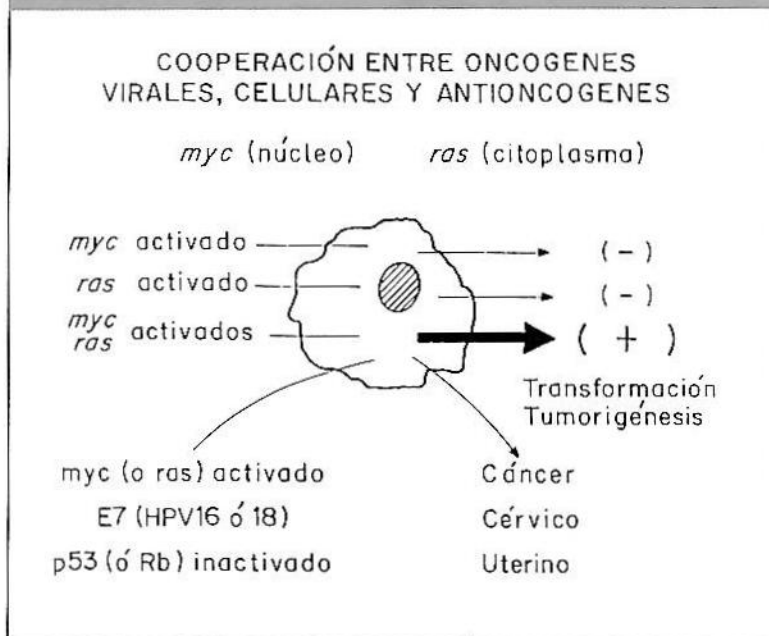
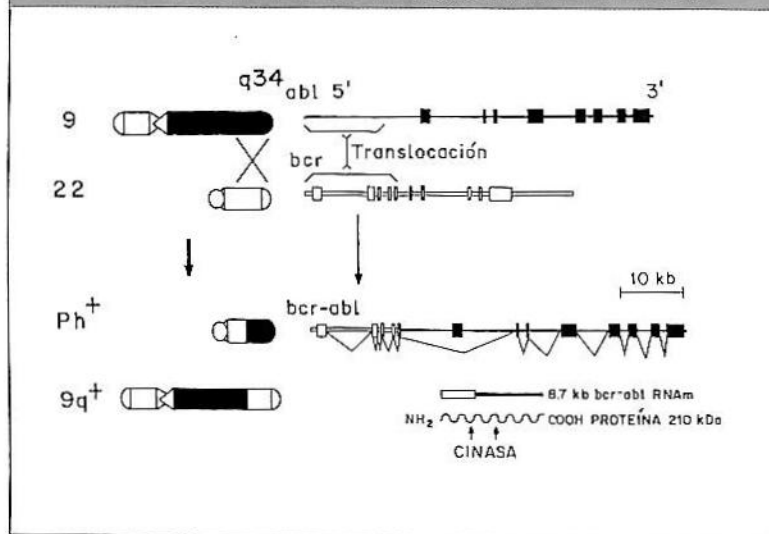



FIGURA 10. EN ALGUNAS LEUCEMIAS SE HA DEMOSTRADO, A NIVEL MOLECULAR, QUE EL PROTOONCOGENE C-ABL LOCALIZADO EN EL CROMOSOMA 9, ESTÁ MODIFICADO Y EN PARTE TRANSLOCADO AL CROMOSOMA 22 (PH), DONDE SE FUSIONA CON EL GEN BCR. EL NUEVO TRANSCRITO PRIMARIO SE PROCESA DE TAL MODO QUE EL PRIMER EXÓN DE ABL SE PIERDE SIEMPRE, PUESTO QUE CARECE DE LA SEÑAL REQUERIDA PARA LIGARSE A LOS OTROS EXONES DE BCR-ABL. EL NUEVO POLIPÉPTIDO HÍBRIDO TIENE ELEVADA ACTIVIDAD TIROSININASA.



cia para combatir tumores inducidos por virus. Sin embargo, los tumores más frecuentes en individuos inmunodeficientes son leucémicas y linfomas, que están asociados con el uso de terapias inmunosupresivas pero no lo están con virus tu-

6. En este trabajo empleamos PCR para la detección de los distintos tipos de PVH y participaron Mauricio Hernández, Eduardo Lazcano, Luz María Rangel y Violeta Ibarra.

molares. Varios ejemplos en animales indican que proteínas virales son capaces de invocar una respuesta inmune que puede prevenir la aparición de un tumor, o bien, inducir la regresión de tumores. La administración de virus *vaccina* recombinante que expresa proteínas de PVH16 (tales como E6 y E7) puede provocar una respuesta inmune en ratas, contra células tumorales transplantadas (células cotransformadas por PVH16 y *ras*). También se encontró que ratones inyectados con virus *vaccina*, modificado para producir la proteína E7 de PVH16, rechazan células que expresan E7 al ser transplantadas a la piel de dichos roedores. Por otro lado, ganado vacuno inyectado con la proteína E7 del papilomavirus bovino es capaz de combatir tumores inducidos por este virus; el tratamiento con la proteína E7 estimuló fuertemente la respuesta inmune celular. Hemos visto, en colaboración con el doctor Lutz Gissmann (Loyola University, Chicago), que la respuesta inmune humoral contra oncoproteínas celulares (*ras*) y contra oncoproteínas virales (E7) se encuentra estimulada en lesiones precancerosas y cancerosas, respectivamente. Con base en estos estudios, es interesante la idea de iniciar protocolos de vacunación (vacuna terapéutica) en pacientes con cáncer cervical avanzado, cuyo diagnóstico ha demostrado que la lesión contiene PVH de alto riesgo; en dichos protocolos, se podrían emplear péptidos de E7 con epítopes fuertes o virus *vaccina* que expresan proteínas tempranas de PVH tipo 16 y 18.

Pensamos que con los avances recientes en el estudio de los oncogenes, los antioncogenes, los virus tumorales y del sistema inmune, se abren nuevas posibilidades respecto al diagnóstico y vacunas, tanto preventivas como terapéuticas en CaCu. 



#### BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, L.; Velázquez, A. y López, E.; Woodworth, C.; Garrido, E.; Gariglio, P. y DiPaolo, J. (en prensa). "Transcriptional Repression in Normal Human Keratinocytes by Wild-type and Mutant p53", en *Cancer Letters*.
- Dahmus, M. (1995). "Phosphorylation of the C-terminal Domain of RNA Polymerase II", en *Biochemica et Biophysica Acta*, 1262: 171-182.
- García, A.; Gariglio, P. y Dahmus, M. (1986). "Structure of Monkey Kidney Cell RNA Polymerase II. Characterization of RNA Polymerase Associated With SV40 Latetranscriptional Complexes", en *Arch Biochem Biophys*, 251: 232-238.
- Gariglio, P.
- \_\_\_\_ Liopis, R.; Oudet, P. y Chambon, P. (1979). "The Template of the Isolated Native SV40 Transcriptional Complexes is a Minichromosome", en *J Mol Biol*, 131: 75-105.
- \_\_\_\_ Ocadiz, R. y Saucedo, R. (1987). "Human Papillomavirus DNA Sequences and *c-myc* Oncogene Alterations in Uterine-cervix Carcinoma", en *Cancer Cells*, 5: 343-348.
- \_\_\_\_ y Rangel, L. (1992). "Virus y cáncer", en *Salud Pub. Méx.*, 308-317.
- González, M.; Barrera, H.; Avilés, L.; Álvarez, L. y Gariglio, P. (1992). "Prevalence in Two Mexican Cities of Human Papillomavirus DNA Sequences in Cervical Cancer", en *Rev Inv Clin*, 44: 491-499.
- Guido, M.; Zamorano, R.; Garrido, E.; Gariglio, P. y García, A. (1992). "Early Promoters of Genital and Cutaneous Human Papillomaviruses are Differentially Regulated by the Bovine Papillomavirus Type 1 E2 Gene Product", en *The Journal of General Virology*, 73: 1395-1400.
- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B. y Harris, C. (1991). "p53 Mutations in Human Cancer", en *Science*, 252: 49-53.
- Miranda, E.; Garrido, E.; García, A. y Gariglio, P. (1992). "Immunoprecipitation of SV40 Replicating Minichromosomes Complexed with Bacteriophage T4 Gene 32 Protein", en *Nucleic Acids Research*, 20: 903-907.
- Ocadiz, R.; Saucedo, R.; Cruz, M.; Graef, A. y Gariglio, P. (1987). "High Correlation Between Molecular Alterations of the *c-myc* Oncogene and Uterine-cervix Carcinoma", en *Cancer Res*, 47: 4173-4177.
- Scheffner, M.; Werness, B.; Huibregtse, J.; Levine, A. y Howley, P. (1990). "The E6 Oncoprotein Encoded by Human Papillomavirus Types 16 and 18 Promotes the Degradation of p53", en *Cell*, 63: 1129-1136.
- Talmage, D.; Freund, R.; Dudensky, T.; Salcedo, M.; Gariglio, P.; Rangel, L.; Dawe, C. y Benjamin, T. (1992). "Heterogeneity in State and Expression of Viral DNA in Polyoma Virus Induced Tumors of the Mouse", en *Virology*, 187: 734-747.
- Ullrich S.
- \_\_\_\_ Anderson, C.; Mercer, W. y Appella, E. (1992a). "The p53 Tumor Suppressor Protein, a Modulator of Cell Proliferation", en *J. Biol. Chem.*, 15259-15262.
- \_\_\_\_ Mercer, W. y Appella, E. (1992b). *Oncogene*, 7: 1635-1643.