

Oncogenes humanos y terapia genética

A.J. González Ordóñez

Servicio de Hematología. Hospital San Agustín. Avilés.

INTRODUCCIÓN

Hace tiempo que los oncólogos tienen el convencimiento de hallar en los sustratos genéticos (ADN/ARN) que controlan la célula las respuestas a los numerosos interrogantes etiopatogénicos del cáncer. Sin embargo, los mecanismos moleculares del origen y permanencia de la célula transformada son aún más diversos y complejos que el amplio conjunto de diferentes enfermedades que se engloban en aquel término. Dado que estos conocimientos están aflorando en cascada, invadiendo ya el área del diagnóstico y desvelando insospechadas posibilidades terapéuticas futuras, parece interesante proceder a revisar el tema.

Definición del oncogén

Por simple asociación de ideas parece inmediata y sencilla la definición "gen del cáncer" o, como los pacientes tienden a pensar, "gen que controla la herencia del cáncer". Esta formulación no sólo es inadecuada, sino que resulta engañosa. Convendrá posicionar los términos cáncer y gen para una correcta definición.

En primer lugar, ¿cómo definiríamos el cáncer?

Cualquier lector culto, incluso ajeno al tema, sugiere "proliferación celular incontrolada", que incluye un hecho clave para la comprensión del proceso: la "evasión o escape" de los mecanismos fisiológicos de control del crecimiento celular; pero realmente, ¿es cierto que exista siempre una hiperproliferación?; parece ser que no. Existen algunos tumores en donde sólo el 1-2 % de las células se encuentran –en un momento dado– en fase S (síntesis de ADN) y la fracción de crecimiento (porcentaje de células en proliferación) no alcanza el 5 %. En ellos la patogénesis es tan distinta que resulta apasionante: acumulación por inmortalización/"anapoptosis" clonal.

Reflexionemos: el ser vivo adulto mantiene un número de células constante desde el final del crecimiento a la involución senil, a pesar de estar sometido a una continua renovación de la mayoría de sus células y tejidos, por el mecanismo de mitosis. Matemáticamente, ello supone que por

cada célula que se renueve así, otra deberá ser anulada para finalmente autodestruirse. Los mecanismos de muerte celular programada recuerdan la involución y muerte de las hojas de un árbol en otoño, por lo que se engloban en el término griego "apoptosis"¹. Viene a definir otra forma de muerte celular ("muerte fisiológica") que no responde a la actuación de una noxa (traumática, térmica, infecciosa, etc.; necrosis, "muerte patológica"), sino a un imperativo genéticamente predeterminado. De esta forma, la célula, que sufre una fragmentación del ADN a diversos niveles por la activación de endonucleasas, involuciona progresivamente y desaparece sin dejar tras de sí el rastro de desechos metabólicos –que condicionan daño tisular (inflamación)– inherente a la otra vía.

Pues bien, la inactivación de las subrutinas de apoptosis en la "célula madre tumoral" puede condicionar la acumulación de esa línea celular, a pesar de tener una fracción de crecimiento poco aumentada (y si la anapoptosis afecta a toda la población tumoral, no se requiere aumento de la fracción de crecimiento).

El efecto final, para un observador ajeno, será el mismo: el aumento constante y progresivo del número de células (n) del tumor. Además, la biología de muchos tumores combina parcialmente (en diversas proporciones) ambos mecanismos (fig. 1).

El nivel diagnóstico habitual podría oscilar entre 5 y 100 g de tumor y se podría considerar "precoz" entre 1-5 g. Pero el tumor tiene una historia previa de meses o años.

Al principio una célula sufre un daño en su información genética que puede ser reparado a nivel molecular, lo cual no tiene ninguna trascendencia y ocurre continuamente (los animales superiores lo somos, entre otras cosas, por haber desarrollado, a lo largo de la evolución, sofisticados sistemas reparadores del ADN. Los ratones empleados en experimentos de carcinogénesis fallecen a menudo, llenos de tumores).

Pero ocurre que si este proceso falla, el gen p53 coloca a la célula en fase G1 del ciclo celular, antes de que la célula comience a "copiar el error", concediéndole un tiempo adicional para reparar la lesión molecular.

Si en algún momento todos estos mecanismos fallan, las células del sistema inmunitario (NK o LAK) pueden reconocer a las células transformadas y destruirlas a condición de que su número sea escaso.

Llegará a haber ocasiones en que la línea celular "transformada" o activada por el cambio sufrido en su genoma alcanzará un número crítico, por encima del cual inexorablemente se producirá un cáncer de trascendencia clínica.

Correspondencia: Dr. A.J. González Ordóñez. Servicio de Hematología. Hospital San Agustín. Camino de Heros, s/n. 33400 Avilés. Asturias.

Recibido el 4 de octubre de 1994. Aceptado para su publicación el 15 de diciembre de 1994.

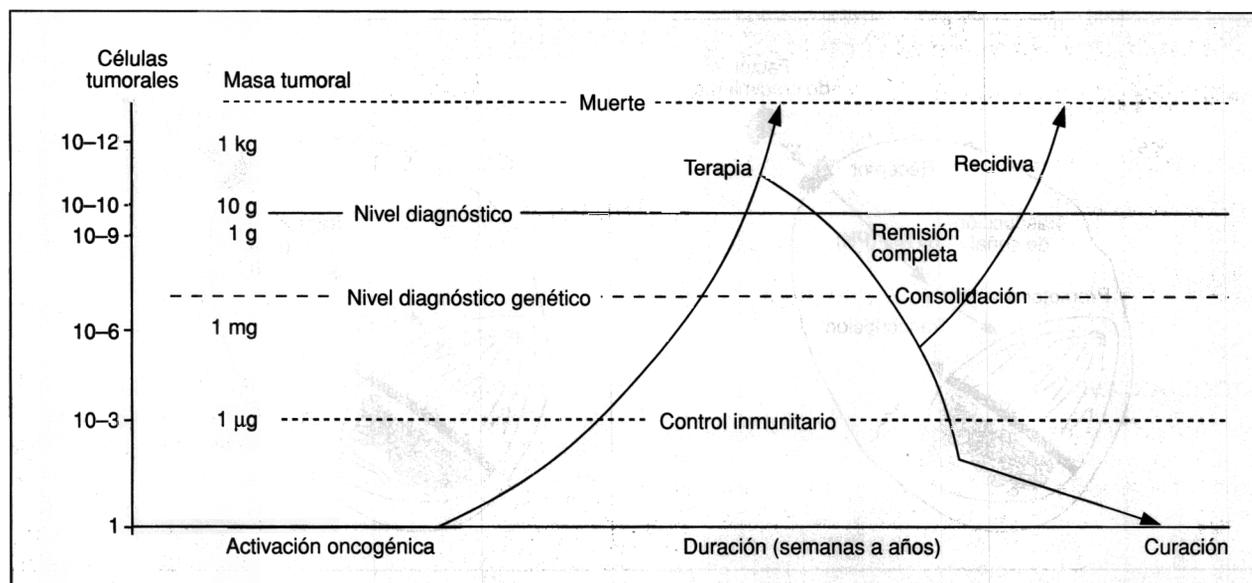


Fig. 1. Biología tumoral.

Durante meses o años (según la cinética de cada caso), evolucionará de forma subclínica hasta el diagnóstico. Si se instaura un tratamiento eficaz (quirúrgico, quimioterápico o radioterápico) se conseguirá quitar a "n" unos cuantos logaritmos (citorreducción), pero pasarán años antes de que estemos seguros de que hemos llegado al nivel crítico del control inmunitario (que podría ser equivalente a curación), ocurriendo a menudo que a pesar de las terapias de consolidación sobreviene una recaída más o menos precoz, según el grado de citorreducción conseguido.

Necesitaremos, pues, monitorizar la "enfermedad residual mínima" para valorar el éxito de la terapia y hacer un seguimiento periódico de los pacientes para detectar la recaída a nivel genético (con tumores clínicamente indetectables), para mejorar de forma muy significativa la curabilidad.

Reflexionemos ahora sobre la definición de gen: básicamente, es la secuencia de ADN que codifica la información necesaria para sintetizar una proteína. Nuestro genoma incluye varios miles de millones de bases (adenina, timina, guanina o citosina) dispuestas en un orden concreto para albergar cientos de miles de genes, que están separadas por secuencias "silentes" (que no se transcriben) denominadas intrones. Los individuos de cualquier especie no sabemos oxidar la glucosa, digerir un triglicérido, acumular energía química para su utilización diferida o llevar el oxígeno a nuestras células, pero el ADN "sí lo sabe". Las diferencias en unas pocas bases de la secuencia son altamente trascendentes y los errores que no siguen el camino de la evolución son eliminados por la selección. Pensemos que las moléculas de la hemoglobina o el fibrinógeno, por ejemplo, son los líderes absolutos de la biosfera (en sus respectivos campos), desde hace cientos de millones de años (del mismo modo, toda la diversidad étnica o interindividual de nuestra especie se sustenta en una –o menos de una– base diferente por cada mil y nuestra "distancia

genómica" a la especie más próxima –chimpancé– es de $6/1.000)^2$.

Secuencias "ATCG" de miles de bases de tamaño son constantemente replicadas fielmente o transcritas "de tres en tres" (triplete o codón) sin error; si se produce un cambio en una sola de ellas se produce un cambio en el sentido de la "frase", bien por codificar un aminoácido diferente, bien por codificar una secuencia de interrupción de transcripción (*stop codon*).

La definición de oncogén podría ser: "cualquier secuencia genética involucrada en la aparición/promoción, desarrollo/progresión de un proceso neoplásico". Sería la versión transformada o activada de un protooncogén normal. Quizá, más de cien (la mayoría compartidos con otras especies) residen en nuestro genoma. La razón de que no sean eliminados por la selección es, lógicamente, que incluyen (en situación normal) información absolutamente básica para la división celular y el desarrollo/diferenciación de los tejidos en la etapa embrionaria o su renovación posterior. Nos apresuramos, así, a aclarar algunos equívocos que afectan a los profesionales no especialistas: primero, la activación protooncogén-oncogén en una célula condiciona una tendencia al desarrollo de un tumor *en esa línea celular*, pero los oncogenes no afectan a las células germinales (óvulo/espermatozoide), por lo cual no se heredan; segundo, son básicos para la vida, por lo cual no se pueden eliminar del genoma.

La conocida, en clínica oncológica, predisposición familiar al cáncer no está mediada por la herencia de oncogenes, sino por otros problemas de naturaleza bioquímica (degradación lenta o ineficaz de cancerígenos; defectos de reparación del ADN) o inmunitaria (déficit de reconocimiento o función *killer*), teniendo conexión con el tema que nos ocupa, sólo en el caso de heredar el estado heterocigoto para un "antioncogén" (p. ej., retinoblastoma hereditario, poliposis colónica familiar o tumor de Wilms familiar).

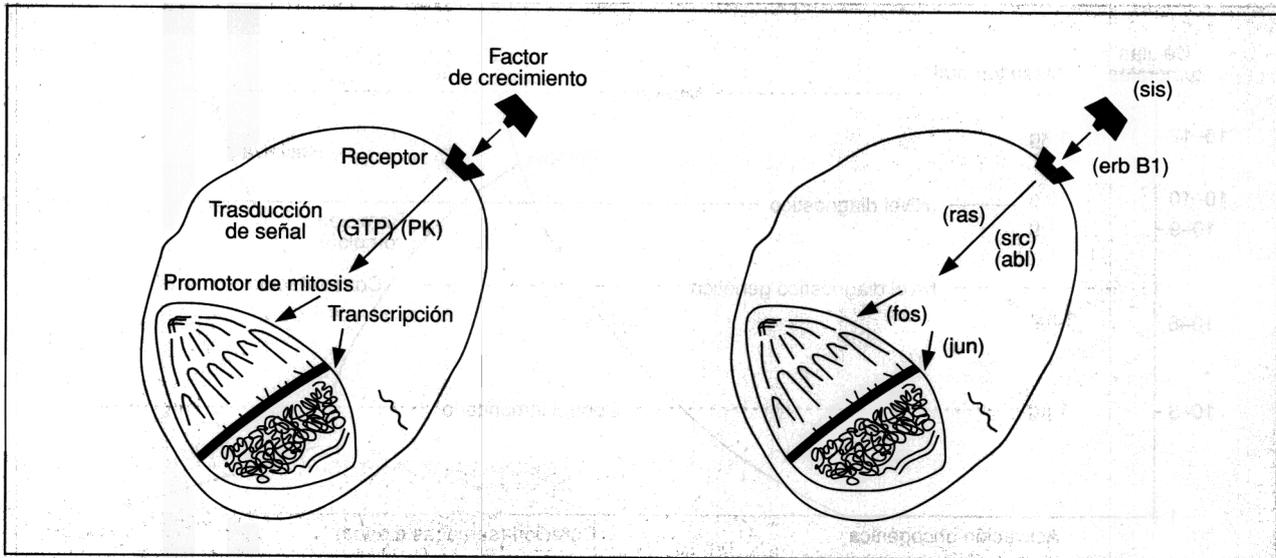


Fig. 2. Estructuras normales de la célula y su "equivalente transformado/canceroso" con los correspondientes oncogenes.

Históricamente, los primeros pasos en esta cuestión se dan en oncogénesis animal por facilidades en experimentación, obteniéndose retrovirus (virus del sarcoma de Rous) causantes de tumores que cumplen todos los postulados (equivalentes a los tres de Koch para enfermedades infecciosas). Al analizar el gen implicado (*src*) se demostró (para sorpresa de la mayoría) que no se trataba de un gen viral, sino celular; esto, que ha ocurrido sistemáticamente después, posibilitó el aislamiento e identificación de numerosos protooncogenes celulares, en los cuales el virus se limitaría a recolocar en otra situación genómica el fragmento previamente extraído, privándole de los mecanismos habituales de control.

Por otra parte, en oncología humana, el estudio sistemático de tejidos tumorales ha ido acumulando evidencias de causalidad desde el hallazgo del cromosoma Filadelfia -t(9;22)- de la leucemia mieloide crónica, en 1960. Recientemente, la tecnología PCR (reacción en cadena de polimerasa) ha posibilitado la amplificación y secuenciación de las regiones implicadas en estos cambios cariotípicos clásicos.

TIPOS DE ONCOGENES

Oncogenes dominantes

Desde el punto de vista genético, los que se manifiestan en forma heterocigota funcionalmente son los verdaderos oncogenes, pues tienden a causar el tumor en la línea celular a la que pertenecía la célula portadora de la activación. Codifican versiones alteradas de sus equivalentes estructuras normales, lo que permite su clasificación funcional (fig. 2).

Tenemos, por ejemplo, una estructura "sis" equivalente a la cadena beta del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), actuando sobre un receptor específico de las células gliales para inducir proliferación *in vitro*, implicada en la etiopatogenia de algunos glioblastomas (tabla 1).

De igual forma, las oncoproteínas erb-B (altamente homólogas del receptor del factor de crecimiento epidérmico/EGFR), situadas en la membrana plasmática, generan una señal mitogénica continua, *ligando-independiente* que promueve el desarrollo de diversos tumores. Hay que decir, sin embargo, que la expresión del m-ARN del protooncogén homólogo "neu" es muy intensa en el sistema nervioso del embrión normal, durante un corto intervalo de tiempo¹⁰.

Mecanismos de activación oncogénica

Translocación y translocación/amplificación

Anomalías cariotípicas con valor patológico bien caracterizado están revelando distintas vías de activación oncogénica. A continuación describiremos algunos ejemplos.

En la leucemia aguda promielocítica se observa invariablemente la t(15;17) (q22;q12-21) que ocasiona el gen de fusión PML-RAR-alfa (*PML-RARA*), en relación con la respuesta clínica (transitoria) al ácido *all*-transretinoico. El gen de la cadena alfa del receptor del ácido retinoico (RAR-alfa), situado en el cromosoma 17 (región q22), rompe a nivel del primer intrón y se funde con un gen del cromosoma 15 llamado PML (promielocítico) previamente roto, dando lugar a un "transcrito de fusión" m-ARN PML/RARA. Como quiera que sólo responden al transretinoico los pacientes con esta anomalía, se hipotetiza que el receptor resultante ha podido perder afinidad por su ligando en concentraciones fisiológicas, requiriéndolo en cantidades masivas para la función normal del gen PML¹¹.

En los linfomas de Burkitt (primarios o secundarios a VIH), se observa activación del protooncogén *c-myc* (integrante del virus de la mielomonocitosis aviar) situado normalmente en la región q24.1 del cromosoma 8. La proteína *myc* está implicada en la proliferación al regular la entrada en ciclo celular (paso de la fase G0 a G1). Sin embargo, en su localización habitual, la porción estructural del gen se halla

TABLA 1. Clasificación funcional de oncogenes

Factores de crecimiento hst sis (homólogo del PDGF) int-2	(reordenamiento) (22q)	Cáncer gástrico Glioblastoma ⁴
Receptores de factores de crecimiento erb-B2/neu (homólogo del EGFR) fms (homólogo del receptor M-CSF) ros, kit y otros	(17p11)	Cáncer de mama/ovario/estómago Glioblastoma ⁴
Receptores de factores de maduración pml/rara (análogo del receptor del ácido retinoico)		Leucemia aguda promielocítica
Tirosincinasas asociadas a membrana abl src fes, fps	(translocación 9q34—22)	Leucemia mieloide crónica ⁶ Leucemia aguda linfoblástica Astrocitoma anaplásico ⁴
Proteínas "flujo-de-señal" asociadas a nucleósidos de guanina gsp Familia ras	(mutación) (H-ras, K-ras, N-ras) (mutaciones Cr.1,2,6,12)	Tumores hipofisarios ³ Cáncer de páncreas (90 %), colorrectal, próstata, adenocarcinoma de pulmón mielodisplásicos y leucemia aguda mieloide, cáncer vesical y otros
Serintreonincinasas citoplásmicas raf/mil mos	(reordenamiento)	Cáncer gástrico
Receptores citoplásmicos de hormonas erb-A	(homólogo receptor de hormonas tiroideas)	(17p)
Factores nucleares promotores de mitosis o transcripción c-myc N-myc L-myc fos myb jun, ets, ski y otros	(translocación 8q24- 14) (amplificación 2p23) (amplificación) (6q22)	Linfoma de Burkitt ⁸ Neuroblastoma infantil Carcinoma pulmonar de células pequeñas Gliomas Gliomas ⁴
Genes de quimiorresistencia mdr-1 (sobreexpresión de glucoproteína P de membrana); diversos tumores en forma natural (páncreas, hígado, riñón) o adquirida tras exposición a quimio/radioterapia (sarcomas infantiles, neuroblastomas y otros) ⁹		
Rutinas de apoptosis bcl-1 bcl-2 (c-myc)		Leucemia linfocítica crónica Linfomas foliculares (80 %)

sometida al control de una secuencia inhibitoria. Como consecuencia de la translocación de las secuencias estructurales aisladas (sin secuencias reguladoras) al cromosoma 14 (región q11.2 de las cadenas pesadas de las IgS) sufre una desregulación con un exceso de moléculas c-myc funcionantes (a partir del transcrito de fusión IgH-c-myc, demostrable por PCR) (fig. 3). A veces la amplificación es tan intensa que tiene una traducción citogenética en forma de "puntos dobles" (PD) correspondientes a múltiples réplicas extracromosómicas, o de "regiones de tinción homogéneas" (RTH), cuando a nivel del cromosoma se apilan en "tándem" 50-100 copias iguales del myc si lo que se amplifica es el número de copias de la parte estructural del gen. El poder patógeno de este oncogén fue demostrado en animales transgénicos; insertándolo en un ovocito de ratón en la vecindad del gen IgH, se producía

—después de un largo tiempo de latencia— un linfoma de Burkitt (células B), mientras que si se situaba en la vecindad del gen del receptor T, el ratón terminaba desarrollando un linfoma de células T. Esto demuestra que los oncogenes no son, a menudo, totalmente específicos y el fenotipo tumoral puede depender también de la región del genoma afectada, del momento de la embriogénesis y de la línea celular que sufra la activación. El largo tiempo de latencia transcurrido desde la lesión del ADN a la aparición del tumor obliga a pensar que un solo oncogén no determina inexorablemente la aparición de la neoplasia, sino que origina "desregulaciones de alto riesgo" que requieren subsiguientes daños acumulativos a lo largo del tiempo (*multi-step* oncogénesis). En la leucemia mieloide crónica, la t(9;22) (q34;q11) (la mejor caracterizada de las translocaciones recíprocas

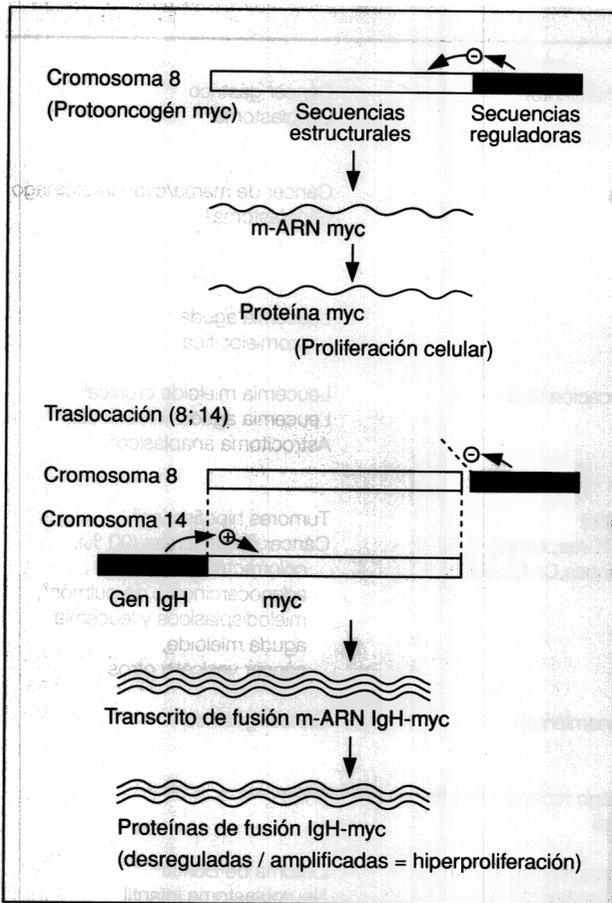


Fig. 3. La translocación de secuencias estructurales sin las correspondientes secuencias reguladoras va a condicionar sobreexpresión; si se trataba de un gen implicado en el crecimiento o división celulares, tenemos un oncogén.

humanas) se activa el protooncogén *abl* (descrito inicialmente en el virus de la leucemia murina de Abelson). Este *abl* se traslada de su localización habitual, en el cromosoma 9, a un área de 5,8 kb llamada *breakpoint cluster region* en el centro del gen *bcr* del cromosoma 22, formando aquí un gen quimérico *bcr-abl* que codifica un transcrito de fusión m-ARN *bcr-abl* de 8,5 kb, para sintetizar una proteína de 210 kd (*p210 bcr-abl*); ésta posee una actividad tirosinfosfocinasa mucho mayor que la *p145 c-abl*, normal. Esta anomalía en la *stem-cell* hematopoyética de la médula ósea condiciona evasión (“escape”) de los mecanismos de control celular, lo que origina una expansión clonal del compartimiento de progenitores medulares¹². La *p210 bcr-abl* no ha sido encontrada en ninguna otra neoplasia distinta de la LMC, lo cual añade una especificidad diagnóstica inhabitual; sin embargo, en algunas formas de leucemia aguda linfoblástica de mal pronóstico, se encuentra una *p190 bcr-abl* asociada también a la *t(9;22)*.

En el 80 % de los linfomas hodgkinianos foliculares, se observó la *t(14;18)* y posteriormente se caracterizó el oncogén *bcl-2* (de la familia *bcl/b-cells lymphoma*), no des-

crito con anterioridad en animales. El protooncogén sintetiza la proteína *bcl-2* normal de la membrana mitocondrial y está implicado en la desconexión de las subrutinas de apoptosis, probablemente permitiendo la supervivencia de los linfocitos portadores de la memoria inmunológica. Su porción estructural se desprende de su segmento regulador en el cromosoma 18 y se sitúa junto a una secuencia amplificadora de la región J del gen *IgH*, en el cromosoma 14; esto condiciona la sobretranscripción de la quimera génica *bcl-2-IgH* (que se puede detectar por PCR) con síntesis de una *p24 bcl-2*, normofuncionante, causante de inmortalización clonal (anapoptosis). Este siniestro escenario, que produce un linfoma B (aparentemente poco agresivo), condiciona, al mismo tiempo, la resistencia de sus células a la muerte drogoinducida, lo que puede significar incurabilidad.

Inserción de secuencias génicas retrovirales

De mucha menor importancia en la oncogénesis humana que en la animal (leucemia felina, bovina o aviar), sólo se ha demostrado inequívocamente en algunas patologías infrecuentes; claramente, el HTLV-1 parece implicado en la leucemia-linfoma T del adulto, no sólo por investigación epidemiológica, sino también por ser capaz de inmortalizar linfocitos T en cultivos celulares. Se acumulan también evidencias que implican al HTLV-II en la rara tricoleucemia-T¹³. El ARN y la retrotranscriptasa virales penetran en el citoplasma y elaboran una réplica de ADN que penetra en el núcleo y se integra en el genoma celular (fase de provirus integrado); así produce genes truncados o genes quimera (retrovirus-célula). Sin embargo, la búsqueda sistemática de proteínas de origen viral es negativa en los tumores, lo que lleva a pensar que cuando se comportan como oncogénicos es porque asientan en la vecindad de protooncogenes celulares, y actuando como *promoters/enhancers* de estos originan la desregulación. Se empiezan a implicar en cáncer de colon y mama.

Mutación

Es un daño puntual del ADN (el menor posible en la secuencia, ya que afecta a una sola base) originado por radiación (de origen humano o natural) o por tóxicos/fármacos alquilantes. Pensemos que la vida se defiende, desde su origen, bajo el filtro atmosférico, de las grandes dosis de radiación X, gamma o protones, que se originan en los núcleos estelares (incluido nuestro Sol), pero que una tasa baja de mutaciones es imprescindible para la adaptación de cada especie a un medio ambiente cambiante y permite la evolución por selección. Estos daños, que pueden ser letales para un miembro individual de una especie, son los mismos que posibilitan el perfeccionamiento de esa especie y de la vida en su conjunto (biosfera), a lo largo de cientos de millones de años.

Las mutaciones puntuales de la familia “*ras*” son las mejor caracterizadas. Tres genes diferentes codifican una proteína similar llamada *p21* y pueden sufrir daños que tienden a concentrarse en regiones sensibles del ADN llamadas *hot spots* (*H-ras* a nivel del codón o aminoácido 12, *N-ras* en el 13 o en el 61 y *Ki-ras*). La “*p21-ras*” normal funciona como

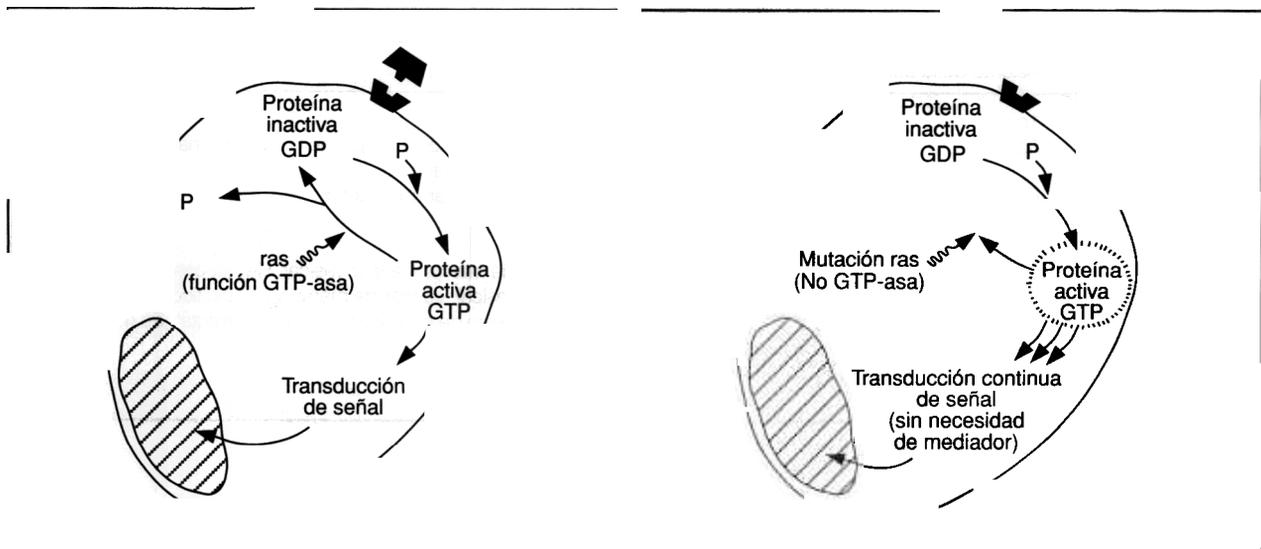


Fig. 4. Si una mutación afecta a la actividad GTP-asa intrínseca que tienen las proteínas ras, puede condicionar un estado de activación celular permanente.

transductor de señales citoplasmáticas, tras la activación del receptor por su ligando específico fosforilándose a nivel de su GDP que pasa a GTP, lo que implica estado activo; así permanece muy poco tiempo porque la p21 posee una actividad GTP-asa intrínseca en otra parte de su molécula, lo que desfosforila el GTP a GDP+P, permitiendo a la célula volver a su estado de reposo. Hemos visto que pueden cambiar algunos aminoácidos de la región desfosforiladora, lo que obliga a la p21 a permanecer en "forma GTP", atrapando a la célula en permanente estado activo (transcripción o mitosis sin que exista ligando en el receptor) (fig. 4).

Se han encontrado mutaciones ras en el 90 % de cánceres de páncreas, 50 % de colon y tiroides, 30 % de mielodisplásicos y leucemias agudas mieloides (N-ras), en adenocarcinomas de pulmón de comportamiento agresivo y en aislados gliomas y cánceres vesicales.

La mutación "gsp" por mecanismo similar se implica en tumor de hipófisis.

Las mutaciones pueden también dañar a uno de los dos alelos de algunos genes supresores tumorales, lo que se detallará más adelante.

Deleción

La pérdida de un fragmento de ADN suele causar, más a menudo, la pérdida de un gen supresor de tumor, por lo que se revisará en el siguiente apartado.

Oncogenes recesivos/genos supresores tumorales

Llamados recesivos porque el daño de un solo alelo no determina la transformación celular, como los vistos hasta ahora; se precisa la alteración de los 2 alelos, por lo que su funcionamiento habitual es como "supresores tumorales" (ordinariamente llamados "antioncogenes").

Determinan los casos de susceptibilidad hereditaria a algún tipo concreto de cáncer, al heredarse una versión dañada

de uno de los dos alelos: como estos sujetos sólo disponen de un alelo normofuncionante, si éste resulta dañado quedan en el estado llamado "nulizigoto" con relativa facilidad, lo que predispone al desarrollo tumoral. Así:

- Retinoblastoma familiar y deterioro del "Rb".
- Tumor de Wilms familiar y deterioro del "WT-1".
- Poliposis colónica familiar y deterioro de "DCC" y "APC"

Todos estos tumores se presentan también en forma esporádica, tras el daño al azar de las dos versiones alélicas. A menudo, como ya se ha mencionado, la célula se transforma tras la deleción de un alelo y la mutación del otro.

Estas deleciones pueden afectar a grandes regiones del ADN, llegando a ser visibles en el cariotipo, lo que facilita su ubicación en el genoma (del 18q, con pérdida de DCC; del 17p, con pérdida de p53; del 13q, con pérdida del Rb o del 11p con pérdida del WT-1) (tabla 2). A continuación mostraremos algunos ejemplos:

Rb. Descrito tras conocerse su implicación en el retinoblastoma familiar, que presentaba la deleción de un alelo en los individuos predispuestos y dos, en los afectados. Se sospechaba que podría bloquear la inactivación de la eucromatina a heterocromatina; en 1990 se confirma que frena la transcripción, el crecimiento celular y las mitosis, al inhibir al promotor del c-fos (un protooncogén ya caracterizado, responsable de aquellas funciones)¹⁴. La célula que pierde la segunda copia del gen Rb se vuelve resistente a las señales de tipo regulador o inhibidor de crecimiento, pudiendo permanecer en continua mitosis. Se demostró su implicación en algunas leucemias (LLC y LAL-T), carcinomas (riñón, vejiga, próstata, mama, microcítico de pulmón) y en el pinealoblastoma. De forma inversa, tras la restauración experimental de la función Rb normal (por transfección retroviral) se ha conseguido bloquear la tumorigenicidad de las células afectadas.

Pronósticas

La presencia de K-ras en el adenocarcinoma de pulmón definió un subgrupo (19/69 pacientes) con comportamiento agresivo y menor supervivencia, independientemente del estadio y del éxito de la cirugía⁷. El erb-B2/neu predice específicamente mal pronóstico en el cáncer de mama con ganglios axilares positivos⁵, y en otro estudio de forma independiente del tamaño tumoral y de la existencia de adenopatías¹⁶. El abl implica mal pronóstico en la LAL. Los daños en la región 17p con pérdida de la p53 implican estadio avanzado y rápida adquisición del fenotipo MDR-1 en diversos tumores (como la crisis blástica de la LMC). La sobreexpresión de bcl-2 implica anapoptosis y resistencia a diversos citostáticos (linfomas de bajo grado).

La existencia de marcadas implicaciones pronósticas provocará en algunos casos la aparición de nuevas clasificaciones o sistemas de estadificación.

Terapéuticas

Gen-terapia. Se ensayan diversas formas de terapia genética, más o menos relacionadas con lo revisado hasta aquí. *Oligonucleótidos sintéticos: "antígeno" y "antisentido".* Denominados "antisentido" cuando son complementarios del m-ARN, actúan impidiendo la fijación del ribosoma por lo que bloquean la traslación del mensaje a proteínas (neutralizando la expresión normal o amplificada, del oncogén). Tienen que diseñarse para discriminar entre el m-ARN quimérico (o de fusión) y el m-ARN normal que puede tener funciones fisiológicas (obviamente, también debe ser diferente de cualquier otro m-ARN); para asegurar la especificidad debe tener una longitud mínima de unas 15 bases, pues los modelos matemáticos predicen que con menos de 10 pueden tener complementariedad en 2.000 regiones diferentes del genoma. Además, hay que asegurarse estabilidad en el citoplasma a través de sustituciones químicas que aporten resistencia a ARN-asas, lo que se está consiguiendo. La tecnología "antisentido" ha frenado crecimientos tumorales en cultivos (cáncer vesical-Ha-ras; Burkitt-c-myc; leucemias-c-myc)¹⁷.

Se denomina estrategia "antígeno" a la creación de ADN complementarios de la secuencia oncogénica, capaces de diferenciarla de la secuencia protooncogénica normal. Esta tecnología está menos desarrollada actualmente y pretende crear una triple hélice a ese nivel, que bloquee la transcripción (se ha conseguido bloquear el c-myc). Se intenta también insertar el oligonucleótido en orientación reversa para que se transcriban m-ARN antisentido in situ. Este proceso se basa en la transfección con retrovirus previamente inactivados, del mismo modo que para la estrategia antisentido se suelen utilizar liposomas o lipoproteínas, que penetran por endocitosis. Así vehiculizados, se han conseguido distribuir a partir de inyección i.v. por todo el organismo (excepto el sistema nervioso central) en ratones (requiriendo diversas infusiones por su vida media corta). Dependiendo de su interacción con proteínas (aún no aclarada) podrán tener más o menos efectos tóxicos.

El principal problema es que el frenado de los oncogenes puede tener un comportamiento tumorostático en lugar de tumorocida, o quizá sólo ser eficaz frente a la primera acti-

vación oncogénica y no frente a las siguientes. Sin embargo, inhibir la sobreexpresión del bcl-2 siempre permitirá restaurar la apoptosis y revertir la quimiorresistencia. De igual modo, la restauración funcional de los "antioncogenes" perdidos (p53, Rb, WT-1) puede bloquear el crecimiento tumoral en cualquier fase.

Quimioprotección medular

A través de un trasplante autólogo de médula ósea, con una *stem-cell* que hubiese recibido previamente el gen *mdr-1* por transfección retroviral, se puede conseguir vencer la temida mielotoxicidad. Esto se ha logrado en ratones transgénicos.

Quimioterapia in situ

Podemos transfectar genes que codifican para enzimas activadoras en las células tumorales; posteriormente, los profármacos inactivos unidos a ligandos-sustrato pueden ser inyectados por vía sistémica sin dañar otros tejidos.

Diversas bioterapias de base genética

El recientemente descubierto "factor inhibidor de leucemia" (LIF; Walter and Eliza Hall Institute, Melbourne) tiene un receptor celular que ya ha sido clonado; la posibilidad de transfectar virus con el gen del receptor para que sea expresado masivamente por las células leucémicas, volviéndolas invariablemente sensibles a esta hormona, genera grandes expectativas.

También es posible transfectar genes de proteínas inmutatrasportantes a las células del tumor para que sean inequívocamente reconocidas por el sistema inmune (células NK y LAK o macrófagos).

Los críticos auguran peligros con estas técnicas porque podrían producirse daños en el ADN; si bien el riesgo de "mutagénesis insercional/integracional" existe, la posibilidad de un segundo tumor es menor que con las terapéuticas (alquilantes o intercaladoras) actuales. Aún más remota es la posibilidad de producir humanos "genéticamente modificados" con estos métodos que no interactúan con las células germinales, pero en todo caso se deberían desarrollar protocolos de uso, de acuerdo al estado de fertilidad del paciente. En el momento actual, son terapias altamente experimentales, por lo que, en todo caso, su ensayo se comenzará con enfermos en fase terminal sin ninguna otra opción terapéutica¹⁸. El USNCI ha aprobado ensayos en varios de estos frentes.

Estos enfoques posibilitarán también la aplicación de terapias auténticamente individualizadas, ya que el panel de oncogenes mostrado por cierto paciente puede incluir dos, habituales en esa variedad de cáncer y quizás uno, o más, conocidos, pero particulares en su caso.

Lo que es indudablemente seguro es que grandes posibilidades terapéuticas nos aguardan, en las próximas décadas, en el desarrollo de estos conocimientos.

Bibliografía

1. Cotter TG. Apoptosis: the art of cell death. *Hellix* 1994; 3: 44-51.

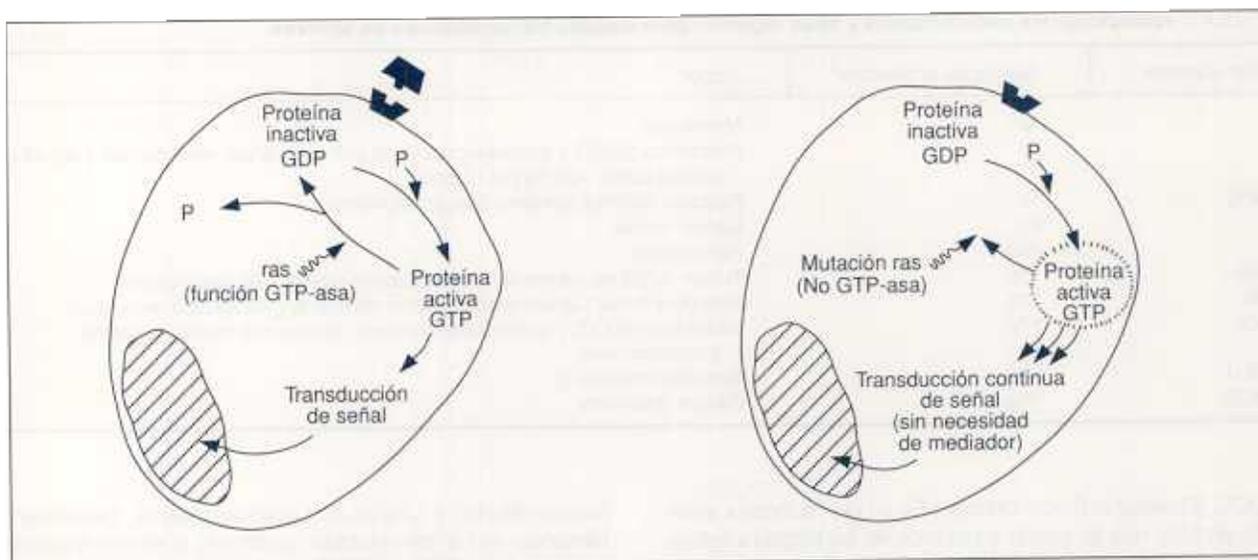


Fig. 4. Si una mutación afecta a la actividad GTP-asa intrínseca que tienen las proteínas ras, puede condicionar un estado de activación celular permanente.

transductor de señales citoplasmáticas, tras la activación del receptor por su ligando específico fosforilándose a nivel de su GDP que pasa a GTP, lo que implica estado activo; así permanece muy poco tiempo porque la p21 posee una actividad GTP-asa intrínseca en otra parte de su molécula, lo que desfosforila el GTP a GDP+P, permitiendo a la célula volver a su estado de reposo. Hemos visto que pueden cambiar algunos aminoácidos de la región desfosforiladora, lo que obliga a la p21 a permanecer en "forma GTP", atrapando a la célula en permanente estado activo (transcripción o mitosis sin que exista ligando en el receptor) (fig. 4).

Se han encontrado mutaciones ras en el 90 % de cánceres de páncreas, 50 % de colon y tiroides, 30 % de mielodisplásicos y leucemias agudas mieloides (N-ras), en adenocarcinomas de pulmón de comportamiento agresivo y en aislados gliomas y cánceres vesicales.

La mutación "gsp" por mecanismo similar se implica en tumor de hipófisis.

Las mutaciones pueden también dañar a uno de los dos alelos de algunos genes supresores tumorales, lo que se detallará más adelante.

Deleción

La pérdida de un fragmento de ADN suele causar, más a menudo, la pérdida de un gen supresor de tumor, por lo que se revisará en el siguiente apartado.

Oncogenes recesivos/genos supresores tumorales

Llamados recesivos porque el daño de un solo alelo no determina la transformación celular, como los vistos hasta ahora; se precisa la alteración de los 2 alelos, por lo que su funcionamiento habitual es como "supresores tumorales" (ordinariamente llamados "antioncogenes").

Determinan los casos de susceptibilidad hereditaria a algún tipo concreto de cáncer, al heredarse una versión dañada

de uno de los dos alelos: como estos sujetos sólo disponen de un alelo normofuncionante, si éste resulta dañado quedan en el estado llamado "nulizigoto" con relativa facilidad, lo que predispone al desarrollo tumoral. Así:

- Retinoblastoma familiar y deterioro del "Rb".
- Tumor de Wilms familiar y deterioro del "WT-1".
- Poliposis colónica familiar y deterioro de "DCC" y "APC".

Todos estos tumores se presentan también en forma esporádica, tras el daño al azar de las dos versiones alélicas. A menudo, como ya se ha mencionado, la célula se transforma tras la deleción de un alelo y la mutación del otro.

Estas deleciones pueden afectar a grandes regiones del ADN, llegando a ser visibles en el cariotipo, lo que facilita su ubicación en el genoma (del 18q, con pérdida de DCC; del 17p, con pérdida de p53; del 13q, con pérdida del Rb o del 11p con pérdida del WT-1) (tabla 2). A continuación mostraremos algunos ejemplos:

Rb. Descrito tras conocerse su implicación en el retinoblastoma familiar, que presentaba la deleción de un alelo en los individuos predispuestos y dos, en los afectados. Se sospechaba que podría bloquear la inactivación de la eucromatina a heterocromatina; en 1990 se confirma que frena la transcripción, el crecimiento celular y las mitosis, al inhibir al promotor del c-fos (un protooncogén ya caracterizado, responsable de aquellas funciones)¹⁴. La célula que pierde la segunda copia del gen Rb se vuelve resistente a las señales de tipo regulador o inhibitor de crecimiento, pudiendo permanecer en continua mitosis. Se demostró su implicación en algunas leucemias (LLC y LAL-T), carcinomas (riñón, vejiga, próstata, mama, microcítico de pulmón) y en el pinealoblastoma. De forma inversa, tras la restauración experimental de la función Rb normal (por transfección retroviral) se ha conseguido bloquear la tumorigenicidad de las células afectadas.

TABLA 2. Antioncogenes caracterizados y otras regiones delecionadas frecuentemente en tumores

Gen supresor	Asiento de la deleción	Tumor
	1p	Melanoma
	3p	Microcítico (SLCC) y adenocarcinoma de pulmón, cáncer renal (familiar y algunos esporádicos). Von-Hippel-Lindau
APC	5p	Poliposis colónica familiar y cáncer colorrectal
	9q	Cáncer vesical
-	10q	Astrocitoma
WT-	11p	Tumor de Wilms, cáncer de mama. Cáncer vesical. Hepatocarcinoma
Rb	13q	Retinoblastoma. Cáncer vesical, cáncer de mama y microcítico de pulmón
p53	17p	Microcítico (SLCC) y epidermoide pulmonar, cáncer colorrectal, de mama y osteosarcoma
NF-1	17q	Neurofibromatosis (!)
DCC	18q	Cáncer colorrectal

DCC. (*Deleted in Colon Cancer.*) Es un gen supresor situado en 18q, que se pierde a menudo en las etapas intermedias del desarrollo del cáncer de colon. Se hereda como rasgo heterocigoto en la poliposis familiar. En estos tumores se formuló la conocida hipótesis de la oncogénesis en pasos (*Multistep Oncogenesis*), posteriormente afirmada por el concepto de oncogenes cooperadores¹⁵ (fig. 5).

WT-1. Gen supresor de la región 11p13, perdido de forma constitucional heterocigota en la predisposición al tumor de Wilms familiar. Los afectados tienen, en las células del tumor, una segunda lesión en este gen.

p53. Gen que toma el nombre de su correspondiente proteína. A diferencia del gen Rb no se delecionan las 2 copias, sino sólo una, asociando una mutación en la otra, pero perdiendo igualmente su función supresora. Esta proteína parece interactuar con factores nucleares de modo que, si aparece un daño en el ADN, detiene el ciclo celular en la fase G1, concediendo a la célula un tiempo adicional para su reparación antes de que el error sea copiado y, por tanto, perpetuado; además, si no se puede reparar "dispara" la activación de las secuencias de apoptosis, lo que le vale el calificativo de *guardian of the cell* para algunos investigadores. La célula dañada se ve privada de los más importantes mecanismos de control. Es el daño genético más habitual de la oncología y a menudo se asocia a progresión (crisis blástica de la LMC con Iso[17]), mal pro-

nóstico (Burkitt y LAL-B) o quimiorresistencia. Experimentalmente, se ha transfectado, probando el efecto antiproliferativo de la p53 en glioblastomas; se ha demostrado capaz de impedir que diversos oncogenes transformaran fibroblastos de rata y se ha conseguido detener el crecimiento de cáncer de colon en cultivos.

ONCOGÉNESIS

La integración "por pasos" de todo lo revisado hasta aquí explica la mayoría de los tumores. Un solo oncogén no va a poder completar el fenotipo tumoral. Así comprobaremos que la transfección del c-myc a embriones de ratón no genera el tumor inmediatamente, precisa tiempo para asociar otras activaciones; sin embargo, si se asocia la transfección del ras, el myc origina anapoptosis e hipersensibilidad a factores de crecimiento y el ras, cambios morfológicos, secreción de factores de crecimiento autocrinos y flujo continuo de señal (independiente de factores de crecimiento), lo que produce tumores agresivos de forma casi inmediata.

Esta cooperación oncogénica explica el conocido comportamiento de tumores que, como el mieloma múltiple, atraviesan por distintas fases de agresividad clínica; segrega su propio factor de crecimiento (IL-6), en mayor cuantía, cuanto mayor es la expresión de la mutación ras, desarro-

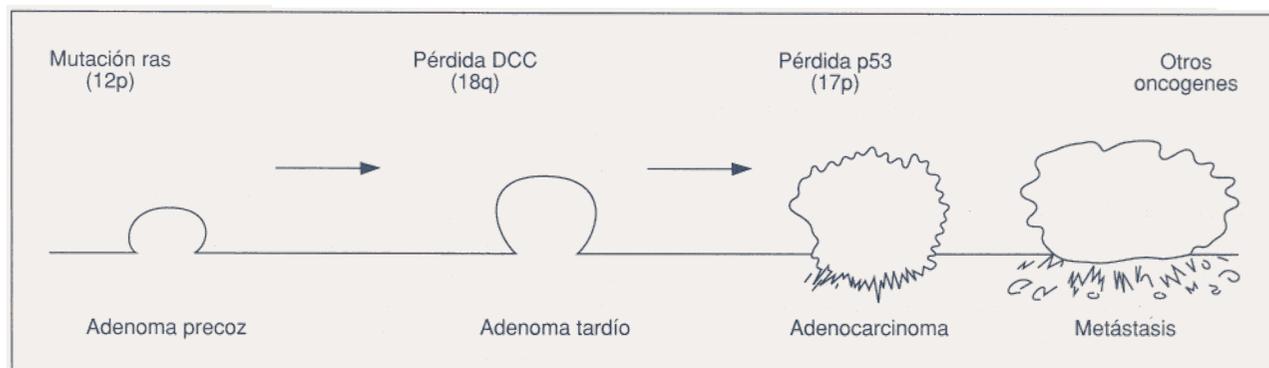


Fig. 5. Modelo de oncogénesis progresiva aplicado al cáncer de colon. La acumulación de daños en el material genético va condicionando la severidad clínica del proceso.

2. Sagan C, Druyan A. Sombra de antepasados olvidados. Barcelona: Planeta, 1993; 79-100.
3. Weinberg RA. Mecanismos moleculares de la carcinogénesis. Scientific American Medicine. Medicina-Oncología 1987; 13-27.
4. Akbasak A, Alibasak S. Oncogenes: cause or consequence in the development of glial tumors. J Neurol Scienc 1992; 111 (2): 119-133.
5. Borg A, Tandon AK, Sigurdsson H, Clark GM, Ferno M, Fuqua SAN et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. Cancer Res 1990; 50: 4.332-4.337.
6. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr-abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990; 247: 824-830.
7. Slebos RJC, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooista A, Stam J, Meijer CJLM et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 1990; 323: 563-565.
8. Dalla Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc oncogen is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 7.284-7.287.
9. Hill BT. Multi-drug resistance mediated by P-glycoprotein. Hellix 1994; 1: 4-11.
10. Kokai Y, Cohen JA, Drebin Greene MI. Stage and tissue-specific expression of the neu oncogen in rat development. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 8.498-8.501.
11. Nichols J, Nimer SD. Transcriptions factors, translocations and leukemia. Blood 1992; 80: 2.953-2.963.
12. De Klein A, Van Kessel GA, Grosveld G. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. Nature (Lond) 1982; 300: 765-767.
13. Leib-Mösch C, Brack-Werner R, Salmons B, Schmidt J, Strauss PG, Hehlmann R et al. The significance of retroviruses in oncology. Onkologie 1990; 13: 405-414.
14. Robbins PD, Horowitz JM, Mulligan RC. Negative regulation of human c-fos expression by the retinoblastoma gene product. Nature (Lond) 1990; 346: 668-671.
15. Fearon ER, Volgenstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 1990; 61: 759-767.
16. Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y, Hirota T, Tsugane S, Watanabe S et al. Correlation between histologic grade of malignancy and copy number of c-erb-B2 gene in breast carcinoma. Cancer 1990; 65: 1.794-1.800.
17. Workman P, D'Incalci M, Berdel WE, Egorin MJ, Helene C, Hickman JA et al. New approaches in cancer pharmacology: drug design and development. Eur J Cancer 1992; 28: 1.190-1.200.
18. Deisseroth A. Gene therapy. MD Anderson Oncolog Bull 1994; 1; 1-2.