
Diferenciación celular y oncogenes

J. León Serrano

Departamento de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander.

Diferenciación celular y regeneración de tejidos

El desarrollo de organismos pluricelulares incluye complejos procesos de organogénesis acompañados de proliferación celular y de especialización progresiva de las células embrionarias en los distintos tipos celulares maduros. Así mismo, casi todos los tejidos de los animales adultos disponen de un repertorio de células precursoras (células madre) capaces de regenerar los distintos tejidos. Algunas de estas células madre permanecen quiescentes hasta que se necesita regenerar el tejido, como ocurre con el músculo (células satélite musculares), mientras que otras están continuamente renovando el tejido (epidermis, epitelio intestinal o sangre). Otros tejidos han perdido irreversiblemente su capacidad de regeneración (el ejemplo típico es el tejido nervioso) y otras células diferenciadas, como los hepatocitos, conservan cierta capacidad de división que permite la regeneración del hígado¹. Sin embargo, las células madre no se diferencian. Su función es producir células que sí lo harán. En cada división, la célula madre da lugar a una célula que seguirá funcionando como célula madre y otra que, o bien sufre un proceso de diferenciación irreversible, o bien sufre algunas divisiones y genera una progenie cada vez más diferenciada hasta la célula madura final. Este último ejemplo es el del tejido hematopoyético, que describiremos con más detalle posteriormente, en el que una misma población de células madre genera todas las células sanguíneas.

Programa genético de diferenciación

En el proceso de diferenciación de una célula animal se pueden distinguir dos fases. En la primera se dice que la célula está «determinada» o *comprometida*. Una célula comprometida no ha perdido su capacidad proliferativa, pero su progenie ya está dirigida hacia un determinado fenotipo y ya no podrá volver a ser indiferenciada. Por tanto, la diferenciación terminal supone, en condiciones normales, un camino sin retorno. Una vez que la célula se «com-

promete», desarrolla un programa genético que consiste en la expresión secuencial de una serie de genes cuyos productos van dando origen a la célula madura. Esta célula expresa genes específicos del tejido que realizan las funciones propias del tejido de que se trata y ha perdido la capacidad de división. Se dice que ha sufrido una diferenciación *terminal*, y está abocada, en un plazo más o menos largo, a la muerte celular.

Es importante tener en cuenta que la diferenciación terminal no implica pérdida de material genético, sino la inducción y represión de genes específicos. Este hecho se demostró en los años setenta con experimentos en los que al trasplantar el núcleo de una célula diferenciada de rana (de la piel o intestino) a un oocito previamente enucleado, proseguía el desarrollo normal del animal². Una conclusión similar se ha obtenido mediante experimentos con heterocariontes; es decir, células que resultan de la fusión de 2 células de distinto origen de modo que ambos núcleos se mantienen separados dentro del heterocarionte. Se demuestra que uno de estos núcleos pasa a expresar genes propios del tejido originario del otro núcleo del heterocarionte. Por ejemplo, núcleos de fibroblastos expresan genes específicos de hígado, páncreas o músculo³⁻⁵.

La expresión de los genes específicos de tejido está muy regulada y en los últimos años se han descubierto gran variedad de factores de transcripción que interaccionan con secuencias de DNA del promotor de estos genes regulando su expresión. Sin embargo, hay más de 100 tipos celulares en vertebrados y, por tanto, la complejidad del proceso en el organismo es enorme y está sometido a un control muy sofisticado. Por otra parte, debemos tener presente que el número de genes específicos de tejido, que son los que se inducen durante la diferenciación, sólo son una minoría en relación al total de genes expresado. Todas las células necesitan de la expresión de un gran número de genes de mantenimiento (*housekeeping*), necesarios para mantener las funciones vitales. Se ha calculado que una célula animal expresa

10.000 a 20.000 genes, pero sólo un 10% de éstos son específicos de tejido; el resto son genes que se expresan en todas las células¹. Aún así, los niveles de expresión de los genes no específicos son diferentes según el tejido de que se trata. Por tanto, la diferenciación celular implica un complejo control de la expresión genética.

Biología molecular de la diferenciación

La diferenciación celular exige la expresión de muchos genes en el momento justo y al nivel adecuado. Pero, a su vez, ¿quién controla esta expresión? Esto viene determinado en principio por señales extracelulares (hormonas, factores de crecimiento y diferenciación) que interactúan con sus receptores celulares y desencadenan una respuesta pleyotrópica, con activación secuencial de genes. Esta activación es básicamente irreversible, lo que explicaría el fenómeno del «compromiso» del proceso diferenciador indicado anteriormente.

Se está llevando a cabo un gran esfuerzo investigador para desentrañar la ruta de transmisión de la señal diferenciadora. La interacción del factor de diferenciación con su receptor genera segundos mensajeros (AMPC, calcio o GTP) que, a su vez, activan una cadena de cinasas y fosfatasa hasta activar la expresión de genes que podríamos definir como genes «maestros». Estos genes codifican proteínas que a su vez inducirían la expresión de aquellos responsables del fenotipo de la célula diferenciada. Incluso en células terminalmente diferenciadas, al estado diferenciado es al menos en parte reversible, y requiere un control activo de la expresión genética para ser mantenido⁶. Nuestro conocimiento de la ruta de transmisión de señal desde el exterior de la célula disminuye al acercarnos al núcleo. Conocemos bien la estructura de muchos receptores de membrana, así como la actividad enzimática que induce en ellos la unión a su ligando (frecuentemente, una actividad proteína tirosincinasa). En los últimos años se han identificado los componentes (segundos mensajeros, proteincinasas y fosfatasa) de la ruta de transmisión de señal para algunos factores de crecimiento y diferenciación. En contraste, poco se conoce acerca de los genes «maestros» que serían activados, en última instancia, por la señal diferenciadora, y que deben ser un conjunto relativamente pequeño de genes.

Actualmente se conocen varios genes que parecen estar implicados, a uno u otro nivel, en

el control de la diferenciación celular. Curiosamente, la mayoría de ellos no se han identificado mediante modelos de diferenciación sino gracias al estudio de células cancerosas, como veremos a continuación.

Cáncer y diferenciación celular

Con alguna excepción (como los hepatocitos), la diferenciación es incompatible con la proliferación y las células madre no realizan las funciones especializadas propias del tejido que regeneran, mientras que las células maduras han perdido irreversiblemente la capacidad mitogénica. Se debe tener en cuenta que las células de un tejido llevan a cabo funciones especializadas que requieren la síntesis de grandes cantidades de proteínas específicas y/o el mantenimiento de una forma determinada (el ejemplo típico de esto último son las neuronas). Durante el período de mitosis, la expresión genética sufre una represión general (debido al superempaquetamiento del DNA en los cromosomas mitóticos) y además obliga a profundos cambios en la morfología celular. Las funciones especializadas de una célula diferenciada quedarían interrumpidas en mitosis.

La incompatibilidad entre proliferación y diferenciación sugiere que deben existir sistemas de «conmutación» que determinen a la célula hacia una fase proliferativa o hacia la diferenciación y que los mecanismos que controlan ambos procesos a nivel molecular deben tener elementos comunes. Este conmutador biológico de dos posiciones (proliferación y diferenciación) es normalmente irreversible. Una prueba indirecta pero contundente de este control común es el hecho de que casi todos los tumores están formados por células mucho menos diferenciadas o inmaduras respecto a las células normales del tejido donde el tumor se ha originado (la excepción parcial está en los teratocarcinomas, que generan también células diferenciadas aunque de fenotipos diversos). El cáncer podría definirse así como la proliferación incontrolada de células que han perdido la capacidad de diferenciarse en células maduras. La transformación cancerosa significa volver a cambiar el «interruptor» biológico mencionado antes. Esta transformación es el resultado de un proceso gradual de acumulación de mutaciones en genes que controlan proliferación y/o diferenciación, como veremos más adelante. A pesar de ello, los mecanismos de control de la diferenciación y proliferación no son idénticos, al menos en algunos tejidos. Existen patologías

TABLA I
ALGUNAS LÍNEAS CELULARES COMÚNMENTE EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DE LA BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA DIFERENCIACIÓN

<i>Línea</i>	<i>Origen o tipo celular</i>	<i>Célula diferenciada</i>
PC12	Feocromocitoma de ratón	Célula neuronal
F9	Teratocarcinoma de ratón	Endodermo parietal
3T3-L1	Fibroblastos de ratón	Adipocito
10T1/2	Fibroblastos de ratón	Mioblasto
Caco2	Carcinoma de colon humano	Enterocito
MEL	Eritroleucemia de ratón	Eritroblasto
M1	Leucemia mieloide de ratón	Macrófago
WEHI-3B	Leucemia mieloide de ratón	Macrófago
HL60	Leucemia mieloide humana	Macrófago o granulocito
U-937	Leucemia mieloide humana	Macrófago
K562	Leucemia mieloide humana	Macrófago o eritroblasto
HEL	Leucemia mieloide humana	Megacariocito

donde sólo uno de los dos procesos parece haber sido afectado. Por ejemplo, la psoriasis es básicamente un defecto del control de proliferación de las células de la capa basal de la epidermis, pero las células inician el programa de diferenciación a queratinocitos normalmente. Mencionaremos más adelante otros ejemplos en el tejido hematopoyético.

A pesar de ello, la desdiferenciación de la célula cancerosa nunca es completa, sino que la célula tumoral retiene muchos marcadores propios del tejido donde el tumor se ha originado. De hecho, el criterio de clasificación de tumores se basa en la morfología, es decir, un criterio de diferenciación y no de proliferación. Este hecho hace que la sensibilidad a quimio o radioterapia, capacidad de metástasis, velocidad de crecimiento, etc., sean tan diferentes de un tipo de tumor a otro. Más aún, las líneas celulares derivadas de tumores son modelos de sus tejidos de origen y casi todo lo que se sabe de los mecanismos de expresión y funciones de genes específicos de tejido a nivel molecular se ha obtenido gracias a estas líneas (que a diferencia de las células normales, pueden crecer en cultivo indefinidamente). Así, la biología molecular del hígado se ha estudiado en líneas de hepatoma, de la piel con líneas de carcinoma epitelial, del intestino con líneas de carcinoma de colon, etc.

La incapacidad de diferenciarse de la célula cancerosa no es siempre irreversible. Expuestas a las señales apropiadas, las células de algunos tumores pueden rediferenciarse. El ejemplo clásico son las células de teratocarcinoma de ratón que trasplantadas a un blastocito se comportan como células normales capaces de

completar el desarrollo del animal. *In vitro* también se puede obtener la diferenciación de células derivadas de tumores por una serie de agentes químicos y citocinas. En estos casos también se observa la asociación entre ausencia de diferenciación y proliferación, de modo que la aparición del fenotipo diferenciado se acompaña de la inhibición de la proliferación. La diferenciación inducida *in vitro* de distintas líneas celulares es un poderoso instrumento para el estudio de la diferenciación. En la tabla I se recogen algunas de las líneas más empleadas en la investigación sobre diferenciación molecular.

Oncogenes y control de la diferenciación

El cáncer es consecuencia de la disfunción progresiva de genes, que, por definición, se han dado en llamar *protooncogenes*, mientras que los oncogenes serían las versiones alteradas de los mismos encontradas en tumores. Los oncogenes pudieron aislarse por ser capaces de producir transformación tumoral al ser introducidos en algún tipo celular (normalmente fibroblastos NIH3T3). En un sentido más amplio, se pueden considerar como protooncogenes todos aquellos genes cuya disfunción afecta a los mecanismos de control de la proliferación. Sin embargo, en los últimos años se han acumulado grandes evidencias de que muchos protooncogenes también están implicados en el control de la diferenciación celular^{7,8}. Esta evidencia es doble. En primer lugar, cuando células en cultivo de distinto tipo son inducidas a diferenciarse, se producen cambios profundos en la expresión de ciertos protoon-

TABLA II
PROTOONCOGENES IMPLICADOS EN DIFERENCIACIÓN CELULAR

Oncogén	Función	Tipo de diferenciación *	
		Inducida	Inhibida
<i>abl</i>	Proteína tirosincinasa		H
<i>erbA</i>	Receptor de hormona tiroidea		H
<i>fms</i>	Receptor de M-CSF	H	
<i>fos</i>	Factor de transcripción		E, H, M
<i>myc</i>	Factor de transcripción	H	A, E, H, M
<i>myb</i>	¿Factor de transcripción?		H
<i>ras</i> * **	GTPasa asociada a membrana	A, E, N	E, M, H
<i>rara</i>	Receptor de ácido retinoico		H
<i>spi-1</i>	Factor de transcripción		H
<i>src</i>	Proteína tirosincinasa	M, N, M	

* A: adipocítica; E: epitélica; H: hematopoyética; M: muscular; N: neuronal. Incluye datos obtenidos *in vitro* en *in vivo*; ** incluye 3 genes: H-*ras*, K-*ras* y N-*ras*.

cogenes. En segundo lugar, la transfección de los oncogenes altera el programa de diferenciación, impidiendo o induciendo la diferenciación, según los casos. Este efecto no es específico del oncogén, sino que un mismo oncogén induce trastornos en la proliferación o bien en la diferenciación según el tipo de célula que sufre dicha alteración. También se han descrito genes implicados en el control de la diferenciación que no se han aislado como oncogenes, como *myoD*, un gen que determina la diferenciación de células musculares⁹.

Actualmente la lista de protooncogenes relacionados funcionalmente con el control de la diferenciación es muy amplia, y en la tabla II se recogen sólo los que se han estudiado mejor. De ellos destacan dos, *ras* y *myc*, que han sido los más extensamente estudiados en modelos de diferenciación y a ellos nos referiremos con mayor detalle.

Oncogenes y la diferenciación de células hematopoyéticas

Todas las células de la sangre, sean de linaje mieloide o linfoide, proceden de una población de células madre pluripotentes. Estas células madre generan en la médula ósea la enorme cantidad de aproximadamente 250 millones de células maduras por minuto que reemplazan las que van muriendo naturalmente. Se debe mantener un exacto equilibrio entre la proliferación de formas inmaduras, la diferenciación y la muerte de células maduras en la sangre y otros órganos. Además, estas células maduras son de 10 tipos diferentes, cada uno en una proporción precisa¹². El proceso viene controlado

por una serie de citocinas (interleucinas, SCL, GM-CSF, G-CSF, M-CSF) que inducen a las células precursoras a diferenciarse hacia uno u otro linaje y por complejas interacciones célula-célula en la médula ósea. La base celular y molecular de este proceso está lejos de ser conocida. Lo que diferencia la hematopoyesis de otros tipos de diferenciación celular es el hecho de que las células precursoras proliferan al mismo tiempo que se diferencian. En la serie mieloide aparecen finalmente células que no se dividen más y sufren una diferenciación terminal a células maduras con distintas funciones: granulocitos (basófilos, eosinófilos, neutrófilos), eritrocitos, mastocitos, megacariocitos-plaquetas, monocitos-macrófagos. Además, las células maduras de la serie linfoide (linfocitos B y T), aunque quiescentes, vuelven a entrar en fase replicativa en respuesta al estímulo antigénico adecuado^{10,11}.

A partir de distintos tipos de leucemias se han establecido líneas celulares. Estas células comparten muchos rasgos propios de células precursoras de los distintos linajes de la serie mieloide o linfoide. Como se ha mencionado, las células progenitoras producen, tras cada división, una célula más diferenciada. Las líneas leucémicas, especialmente las derivadas de leucemia mieloide aguda, pueden ser diferenciadas *in vitro* por citocinas y fármacos antileucémicas. Por tanto, las líneas de leucemia mieloide son muy utilizadas como modelos de diferenciación y gracias a ellas se pueden empezar a desentrañar los mecanismos moleculares que ocasionan la diferenciación celular^{12,13}. En la tabla I se han recogido las líneas más empleadas.

Conocemos una serie de genes importantes para el control de la diferenciación. Estos genes fueron inicialmente descubiertos como oncogenes al encontrarse alterados en leucemias, y pueden dividirse por su tipo de activación en tres grupos^{14,15}: a) aquellos activados al ser puntos de rotura de translocaciones cromosómicas, *c-myc*, *bcl-2*, *rar*, *pml*, *bcr*, *abl*, *scl*, *hox11*; b) aquellos activados por mutaciones puntuales en su secuencia codificante, *N-ras*, *p53*, *fms*, y c) aquellos encontrados en retrovirus leucemogénicos en animales, *c-myc*, *H-ras*, *K-ras*, *myb*, *erb-A*, *spi-1*. Los tres últimos no se han encontrado activados en leucemia humana.

Las leucemias mieloides como modelos *in vivo* de diferenciación.

Oncogenes *abl* y *N-ras*

En la leucemia mieloide crónica (LMC) se observa un exceso de células en sangre, si bien son formas maduras. La enfermedad afecta a todos los tipos celulares, pero con prevalencia de granulocitos. El defecto en la LMC está en el control de la proliferación en las células madre de la médula ósea, mientras que las células, en la fase crónica de la enfermedad, se diferencian normalmente. Tras varios años de fase crónica, suele producirse una crisis blástica donde aparece un clon celular indiferenciado (blástico) y con alta capacidad proliferativa, que da lugar a una enfermedad semejante a la leucemia mieloide aguda. En todas las células de la médula y sangre circulante de estirpe mieloide se produce una translocación [t(9;22)] que genera un gen híbrido de 2 genes originales de cromosomas diferentes: *bcr* y *abl*. Este último también aparece en un retrovirus que produce leucemias en ratones. *abl* codifica para una proteína tirosinasa cuya actividad parece, por tanto, importante en el control de la proliferación de células hematopoyéticas¹⁵.

El caso inverso a la LMC se encuentra en los síndromes mielodisplásicos (SMD) (del que existen 5 tipos). Es una situación preleucémica en la que se produce cierto exceso de precursores hematopoyéticos que no maduran normalmente, aunque no llegan a acumularse en sangre circulante. Después de varios años, el SMD suele evolucionar hacia una leucemia mieloide aguda. El defecto se encuentra también en las células madre pluripotentes, pero aquí se bloquea la diferenciación, mientras que la proliferación se mantiene sometida a control. Es de destacar que la frecuencia de mutaciones del gen *N-ras* es muy alta (40-50%), curiosamen-

te mayor que en las leucemias agudas (20-30%)¹⁶. Esto indica un papel de *N-ras* en el control de la diferenciación de células hematopoyéticas, y no sólo en la proliferación. Volveremos con más detalle a los genes *ras* y se describirá un caso similar en tumores de piel. Las LMC y SMD ofrecen modelos *in vitro* en los que sólo el control de la proliferación o de la diferenciación está alterado. Sin embargo, la leucemia aguda maligna es siempre causada por un clon donde ambos controles están bloqueados. Estos modelos demuestran que ambos procesos, si bien tienen controles comunes, también los tienen específicos. Pero, en cualquier caso, para generar una célula tumoral maligna es necesaria la acumulación de mutaciones en genes implicados en el control de ambos procesos.

Oncogén *c-myc* y diferenciación de células hematopoyéticas

El oncogén *c-myc* pertenece a una familia con al menos otros 2 miembros (*L-myc* y *N-myc*). El oncogén *c-myc* fue originalmente descubierto en retrovirus que producían leucemias en aves y porque aparece implicado en una translocación cromosómica en el linfoma de Burkitt humano. El producto del gen *c-myc* es una proteína que se localiza en el núcleo celular donde dimeriza con otra (*Max*) y activa la transcripción de genes aún desconocidos^{17,18}. Si se conoce, desde hace tiempo, que el gen *c-myc* desempeña un importante papel en el control de la diferenciación celular^{19,20}. Esto es más cierto para células hematopoyéticas. Esta relación entre *c-myc* y diferenciación hematopoyética se resume por los siguientes datos¹⁸⁻²⁰:

1. La expresión de *c-myc* disminuye o se anula en células de distintas líneas mieloides humanas (U937, HL60, K562) o de ratón (M1, MEL) cuando son inducidas a diferenciarse *in vitro* por distintos agentes.
2. La expresión forzada de *c-myc* en algunas líneas mieloides (MEL, HL60, M1) inhibe su diferenciación *in vitro*. En otros modelos de diferenciación como la de los adipocitos o mioblastos se reproduce este efecto.
3. La inhibición de la expresión de *c-myc* mediante oligonucleótidos o RNAm antisentido induce la diferenciación de algunas líneas mieloides (MEL, HL60) en ausencia de inductores químicos.
4. En un porcentaje significativo de enfermos de leucemia mieloide aguda se observa expresi-

sión aumentada de *c-myc*. En el 100% de casos de linfoma de Burkitt se produce una translocación [t(8;14)] que yuxtapone un gen de inmunoglobulina delante del *c-myc*, resultando de la expresión desregulada de *c-myc*. La expresión forzada de *c-myc* también transforma linfocitos *in vitro* y la administración de ciertos carcinógenos en ratones provoca el desarrollo de plasmacitomas que llevan reordenamientos inmunoglobulina-*c-myc* semejantes a los del linfoma de Burkitt^{14,15,19}.

Es obvio que la proteína c-Myc desempeña un papel en la conmutación entre proliferación y diferenciación tanto en células de la serie mieloide como linfoide. De acuerdo con lo anterior se ha postulado que la expresión de *c-myc* es necesaria para mantener a las células en un estado proliferativo, incompatible con la diferenciación, de modo que su sobreexpresión inhibe a ésta. Sin embargo, otros datos indican que la hipótesis puede no ser de aplicación general:

1. La cotransfección de linfocitos inmaduros (células pre-B) con los oncogenes *raf* (una proteína serinincinasa) y *c-myc* hace que se diferencien, pero, curiosamente, no a células B maduras, sino a una célula con fenotipo de macrófago¹⁵ (esto también demuestra que la segregación entre los linajes mieloide y linfoide no es irreversible).

2. La infección de ratones con un virus que lleva el oncogén *abl* produce linfomas (células pre-B), pero si el virus expresa además *c-myc*, los tumores que aparecen son plasmacitomas, es decir, de un tipo celular más diferenciado²¹.

3. En algunas líneas mieloides como K562 y U937 se puede obtener citostasis con mantenimiento de niveles elevados de *c-myc*, y su expresión forzada no inhibe su diferenciación (M. Gómez-Casares, M.D. Delgado y J. León, observaciones no publicadas).

Oncogén H-ras y diferenciación celular

La familia de genes *ras* de mamíferos está formada por tres miembros: H-*ras*, K-*ras* y N-*ras*. Codifican para pequeñas proteínas con actividad GTPasa ancladas a la parte interna de la membrana celular. Allí interactúan, a través de otras proteínas, con receptores de factores de crecimiento y diferenciación. Las proteínas *ras* deben estar unidas a GTP para ser activas en su función de transmisión de señal²². Las formas oncogénicas presentan mutaciones en un aminoácido (en la posición 12 o 61), carecen de actividad GTPasa y están, por tanto, en

forma activa (*ras*-GTP) de forma constitutiva²². El oncogén H-*ras* fue el primero aislado de un tumor humano. Después se han encontrado genes *ras* mutados en numerosos tumores, siendo los oncogenes hallados con más frecuencia en el cáncer humano²³. Ya se ha mencionado anteriormente la frecuente activación de N-*ras* en leucemia mieloide aguda y síndrome mielo-displásico^{16,23}. También se ha visto que la expresión de H-*ras* disminuye drásticamente durante la diferenciación *in vitro* de algunas líneas de leucemia mieloide²⁴. Es muy frecuente la activación de K-*ras* en carcinoma de páncreas y colon (un 7 y un 4%, respectivamente)²⁵ y de H-*ras* en tumores de piel, tanto humanos²³ como experimentales²⁶.

En muchas células la presencia de oncogenes *ras* induce un fenotipo más proliferante, tumorigénico. El ejemplo clásico son los fibroblastos de ratón NIH3T3, en los que la expresión de genes *ras* activados induce un profundo cambio fenotípico a células más transformadas. Gracias a las células NIH3T3 se aislaron los genes *ras* y la mayoría de los oncogenes actualmente conocidos. La expresión de genes *ras* activados se acompaña frecuentemente de una desdiferenciación celular. Este es el caso, por ejemplo, de células musculares cuya diferenciación es inhibida por H-*ras*²⁷. Sin embargo, en los últimos años se vienen encontrando evidencias que revelan una relación de los protooncogenes *ras* con el control de la diferenciación. A continuación se mencionan cuatro modelos de diferenciación donde esta relación es más evidente. Pondremos más énfasis en dos de ellos.

Diferenciación neuronal

Un modelo muy utilizado de diferenciación de células nerviosas es el inducido en línea de feocromocitoma de rata PC-12. Estas células responden al factor de crecimiento nervioso (NGF) cesando en su crecimiento e iniciando un proceso de diferenciación a células de tipo neuronal con emisión de prolongaciones dendríticas. Fue una sorpresa descubrir que al transfectar estas células tanto con el oncogén H-*ras*, K-*ras* o N-*ras* las células se diferenciaban de manera análoga a con NGF^{28,29}. El mismo efecto diferenciador de PC12 se ha demostrado para el oncogén *src*, que codifica para una proteína tirosinincinasa.

Diferenciación de adipocitos

Los fibroblastos de ratón de la línea 3T3-L1 se diferencian a adipocitos una vez que alcan-

zan la confluencia en presencia de insulina. Esta diferenciación es detectable por la acumulación de gotas de grasas e inducción de enzimas relacionadas con el metabolismo lipídico. En estas células, al ser transfectadas con los oncogenes *H-ras* o *N-ras*, las células se diferencian sin necesidad de añadir insulina³⁰.

Diferenciación de células vulvares de nematodos e insectos

El nematodo *Caenorhabditis elegans* es un modelo ampliamente usado para el estudio de la diferenciación al tener determinados todos los linajes celulares desde etapas tempranas de su desarrollo. Se ha demostrado que la actividad del gen homólogo de *ras* (llamado *let-60* en *C. elegans*) es necesaria para que las células larvarias precursoras de la vulva formen el órgano del animal adulto. Al igual que en mamíferos, la forma activa de la proteína es la unida a GTP³¹. De manera semejante, la actividad *ras*-GTP es necesaria para la diferenciación de las neuronas fotorreceptoras de *Drosophila melanogaster*³².

Diferenciación epitelial

La epidermis es un tejido que se está regenerando continua y activamente a partir de una población de células madre unipotentes: las células de la capa basal. En cada división producen, además de otra célula madre, una célula que ya no se divide más y que va diferenciándose progresivamente, cargándose de queratinas y ocupando posiciones cada vez más externas hasta convertirse en una escama de queratina. La alta frecuencia de *H-ras* activado en tumores de piel inducidos por aplicación tópica de carcinógenos en animales o por infección de retrovirus de Harvey (v-*H-ras*) sugieren que la disfunción de *ras* es causa de la proliferación incontrolada acompañada con desdiferenciación de células epiteliales²⁴. Además, queratinocitos transfectados con genes *ras* activados pierden la dependencia de EGF (factor de crecimiento epidérmico) para su crecimiento y otros marcadores de diferenciación³³.

Sin embargo, otros estudios más recientes sugieren que la asociación entre la presencia de *ras* activado y desdiferenciación de queratinocitos no es tan clara. Por ejemplo, estudios realizados con queratoacantomas indican que el gen *H-ras* también puede desempeñar un papel en la diferenciación de los queratinocitos. Estos tumores, tras una fase de rápido crecimiento, sufren un proceso de rediferenciación,

de modo que el tumor remite espontáneamente. Tanto en queratoacantomas de conejo inducidos experimentalmente como en queratoacantomas humanos, se observa activación de *H-ras* con alta frecuencia³⁴. En el caso humano, esta frecuencia (30%) es incluso mayor en queratoacantomas que en carcinomas (13%)³⁵. En consonancia con esto, existen líneas de queratinocitos con *H-ras* activado que conservan la morfología epitelial y la expresión de marcadores de diferenciación como cadherinas³⁶. Otro ejemplo de que *H-ras* no bloquea el programa diferenciador en la piel lo proporcionan ratones transgénicos que expresan el oncogén *H-ras* en queratinocitos. Estos ratones desarrollan hiperplasias de piel pero no carcinomas^{37,38}.

La diferenciación celular como terapia anticancerosa

Si el cáncer es un desorden tanto de diferenciación como de proliferación, la terapia anticancerosa podría dirigirse tanto a inhibir la segunda como a estimular la primera. En la práctica la inmensa mayoría de los anticancerosos son inhibidores de replicación de DNA, de transcripción o de mitosis y actúan como citotóxicos sobre células que se dividen activamente. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, las células cancerosas no han perdido irreversiblemente su capacidad de diferenciarse y pueden ser inducidas a diferenciación terminal mediante el estímulo apropiado. Esta es la base de la terapéutica anticancerosa basada en fármacos no citotóxicos sino capaces de inducir la diferenciación. El número de agentes de síntesis y naturales capaces de inducir diferenciación *in vitro*, especialmente de células mieloides, es muy amplio, y entre ellos existen fármacos habitualmente usados como antileucémicos (arabinósido de citosina, hidroxiurea, o daunomicina¹²). Sin embargo, muy pocos han mostrado utilidad en cáncer humano por su efecto diferenciador. Entre éstos destaca el ácido retinoico, usado en algunos cánceres de piel y sobre todo en una leucemia mieloide, la leucemia aguda promielocítica. En esta leucemia se produce una translocación cromosómica que afecta al gen de un receptor del ácido retinoico (*rara*)³⁹. Otros fármacos habitualmente usados como citotóxicos (arabinósido de citosina o daunomicina) se han utilizado a bajas dosis como diferenciadores en casos de SMD¹⁶, así como algunas citocinas: interferón alfa y GM-CSF³⁸. Los ensayos clínicos de agentes diferenciadores en el tratamiento del cán-

cer se están multiplicando. La ventaja teórica de este abordaje es su baja toxicidad general, ya que sólo actuaría sobre células indiferenciadas pero no tendría ningún efecto sobre las células normales ya diferenciadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Molecular biology of the cell. 2ª ed. Nueva York y Londres: Garland, 1989.
- Gurdon JB. The control of gene expression in animal development. Cambridge: Harvard University Press, 1974.
- Blau HM. How fixed is the differentiated state? Trends Genet 1989; 5: 268-272.
- Spear BT, Tilgham SM. Role of α -fetoprotein regulatory elements in transcriptional activation in transient heterokaryons. Mol Cell Biol 1990; 10: 5.047-5.054.
- Wu K, Samuelson LC, Howard G, Meisler MH, Darlington GJ. Transactivation of pancreas-specific gene sequences in somatic cell hybrids. Mol Cell Biol 1991; 11: 4.423-4.430.
- Blau HM. Differentiation requires continuous active control. Ann Rev Biochem 1992; 61: 1.213-1.230.
- Adamson ED. Oncogenes in development. Development 1987; 99: 449-471.
- Boettiger D. Interaction of oncogenes with differentiation programs. Curr Topics Microbiol Immunol 1989; 147: 31-78.
- Tapscott SJ, Davis RL, Thayer MJ, Cheng PF, Weintraub H, Lassar AB. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a *myc* homology region to convert fibroblasts to myoblasts. Science 1988; 242: 405-411.
- Dexter TM, Spooner E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. Annu Rev Cell Biol 1987; 3: 423-441.
- Nicola NA. Hemopoietic cell growth factors and their receptors. Ann Rev Biochem 1989; 58: 45-77.
- Abraham J, Rovera G. Inducers and inhibitors of leukemic cell differentiation in culture. En: Baserga R, editor. Tissue growth factors. Berlín; Springer-Verlag, 1981; 405-425.
- Lübbert M, Koeffler HP. Myeloid cell lines: tools for studying differentiation of normal and abnormal hematopoietic cells. Blood Rev 1988; 2: 121-133.
- Rabbitts TH. Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias.
- Sawyers CL, Denny CT, Witte O. Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. Cell 1991; 64: 337-350.
- List AF, Garewal HS, Sandberg AA. The myelodysplastic syndromes: biology and implications for management. J Clin Oncol 1980; 8: 1.424-1.441.
- Dang CV. c-Myc oncoprotein function. Biochim Biophys Acta 1991; 1.072: 103-113.
- Lüscher B, Eisenman RN. New light on Myc and Myb. Part I. Myc Genes Develop 1990; 4: 2.025-2.035.
- Marcu KB, Bossone SA, Patel AJ. *myc* function and regulation. Ann Rev Biochem 1992; 61: 809-860.
- Meichle A, Philipp A, Eilers M. The functions of Myc proteins. Biochem Biophys Acta; 1992: 1.114: 129-146.
- Weissinger EM, Mishak H, Goodnight J, Davidson WF, Mushinski JF. Addition of constitutive *c-myc* expression to abelson murine leukemia virus changes the phenotype of the cells transformed by the virus from pre-B-cell lymphomas to plasmacytomas. Mol Cell Biol 1993; 13: 2.578-2.585.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. Nature 1990; 349: 117-127.
- Bos JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res 1989; 49: 4.682-4.689.
- Delgado MD, Quincoces A, Gómez-Casares MT, Martínez CA, Cuadrado MA, Richard C et al. Differential expression of *ras* protooncogenes during *in vitro* differentiation of human erythroleukemia cells. Cancer Res 1992; 52: 5.979-5.984.
- Capella G, Cronauer-Mitra S, Peinado MA, Peruchio M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the *c-K-ras* gene human tumors. Env Health Perspect 1991; 93: 125-131.
- León J, Pellices A. *Ras* involvement in carcinogenesis: lessons from animal model systems. En: McCormick F, Lacal JC, editores. G-binding proteins: the *ras* superfamily. CRC Critical Reviews. Nueva York. Academic Press, 1993; 3-35.
- Olson EN, Spizz G, Tainsky MA. The oncogenic forms of N-*ras* of H-*ras* prevent skeletal myoblast differentiation. Mol Cell Biol 1987; 7: 2.104-2.111.
- Noda M, Ko M, Ogura A, Liu D, Amano T, Takano T et al. Sarcoma viruses carrying *ras* oncogenes induce differentiation-associate properties in a neuronal cell line. Nature 1985; 318: 73-75.
- Guerrero I, Wong H, Pellicer A, Burnstein, DE. Activated N-*ras* gene induces neuronal differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cell. J Cell Physiol 1986; 129: 71-76.
- Benito M, Porras A, Nebreda AR, Santos E. Differentiation of 3T3-L1 fibroblasts to adipocytes induced by transfection of *ras* oncogenes. Science 1991; 253: 565-568.
- Sternberg PW, Horvitz HR. Signal transduction during *C. elegans* vulval induction. Trends Genet 1991; 7: 366-371.
- Bonfini L, Karlovich CA, Dasgupta C, Banerjee U. The *Son of sevenless* gene product: a putative activator of Ras. Science 1992; 225: 603-606.
- Wissman B, Aaronson SA. Members of the *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* 1985; 5: 3.386-3.396.
34. León J, Kamino H, Steinberg JJ, Pellicer A. *H-ras* activation in benign and self-regressing skin tumors (keratoacanthomas) in both humans and an animal model system. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 786-793.
 35. Corominas M, Kamino H, León J, Pellicer A. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation? *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 6.372-6.376.
 36. Navarro P, Gómez M, Pizarro A, Gamallo C, Quintanilla M, Cano A. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol* 1991; 115: 517-533.
 37. Bailleul B, Surani MA, White S, Barton SC, Brown K, Blessing M, Jorcano et al. Skin hyperkeratosis and papilloma formation in transgenic mice expressing a *ras* oncogene from a suprabasal keratin promoter. *Cell* 1990; 62: 697-708.
 38. Compere SJ, Baldacci PA, Sharpe AH, Jaenisch R. Retroviral transduction of the human c-Ha-ras-1 oncogene into midgestation mouse embryos promotes rapid epithelial hyperplasia. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 6.
 39. Parkinson DR, Smith MA, Cheson BD, Stevenson HC, Friedman MA. Transretinoic acid and related differentiated agents. *Sem Oncol* 1992; 19: 734-741.

DISCUSIÓN

- F. RUIZ-CABELLO: Quería hacer sólo una matización, y es que hay una excepción al principio general de que toda célula madura o diferenciada es incapaz de dividirse, que es el linfocito.
- J. LEÓN: Es cierto, y existe una segunda excepción, que es el hígado. El hígado puede regenerar y lo que regenera son hepatocitos diferenciados.
- A. FABRA: He encontrado a faltar una tercera «categoría» de oncogenes, que serían los genes relacionados con el rescate de la muerte celular programada en procesos en los que las células madre pueden desembocar en una diferenciación y dentro de esta determinada diferenciación, llegará un momento en que las células sufrirán una muerte celular programada, y determinados oncogenes o incluso genes supresores de tumores pueden actuar rescatando a la célula de esta muerte celular programada. Me gustaría discutir el papel que en un momento determinado los oncogenes o genes supresores de tumores, o sus propios productos, pueden desempeñar a favor o en contra de este equilibrio, entre proliferación celular y diferenciación.
- J. LEÓN: Supongo que se refiere básicamente a BCL2, que efectivamente es un gen originalmente aislado de leucemias linfocíticas, foliculares, y que se ha comprobado que inhibe la apoptosis (muerte celular programada) especialmente en modelos linfoides. También quisiera señalar que el *myc* lo que hace en otros modelos es inducirlo de modo que, efectivamente, éste es un punto importante, que requiere más investigación.
- J. VICENTE: Hay un aspecto que me ha intrigado muchísimo, y es que cuando se estimula con un oncogén *ras* a ciertos tipos de células, éstas se diferencian en lugar de entrar en proliferación, y eso ocurre básicamente en células derivadas del sistema nervioso, con la estimulación del factor de crecimiento neurogénico. Actualmente parece admitirse que esto estaría relacionado con la línea por la que el *ras* expresa su señal, en este caso, a través de la neurofibromina, lo que se comprende bastante bien en el sistema nervioso, pero ¿qué pasa en la piel?, ¿ocurre lo mismo?
- J. LEÓN: No dispongo de información para contestar directamente a esta pregunta.
- J. VICENTE: Lo curioso es que aparentemente es un tumor que se estimularía, y en los epidermoides, por ejemplo, ocurre lo contrario.
- J. LEÓN: Se debe tener muy en cuenta el modelo utilizado ya que si se aplica dimetilbenzotrantraceno en otro animal u otra zona que no sea la parte interna de la oreja del conejo no se obtienen queratocantomas, sino fundamentalmente papilomas o carcinomas epidermoides.
- G. CAPELLÁ: En relación con la anterior pregunta de A. Fabra: ¿han evaluado la apoptosis en algunas de estas líneas?
- J. LEÓN: En el modelo al que me he referido en mi exposición hemos probado citarabina, hidroxiaurea y TPA y hemos observado que lo que se produce es una diferenciación sin apoptosis. Sólo hemos encontrado un agente que provoca apoptosis en estas células, que es un inhibidor de fosfatasa, ácido okadaico.
- V. VICENTE GARCÍA: Quisiera hacer un comentario general al controvertido tema de diferen-

ciación y proliferación, para señalar que algunos grupos de investigadores están empleando otras aproximaciones tales como el estudio del inmunofenotipo en leucemias, y curiosamente algunos encuentran que en contra del tópico de a mayor diferenciación menor proliferación, parece observarse que a mayor diferenciación celular mayor proliferación. Es decir, creo que nos encontramos en un terreno todavía lo suficientemente abierto como para explorar distintos enfoques a través de la ideología molecular o el inmunofenotipo.

M. DÓMINE: Quería preguntar al Dr. León cuáles son estos genes maestros de la diferenciación, si son básicamente los genes *oncosupresores*, o están implicados otros genes.

J. LEÓN: Creo que, lógicamente, los genes maestros debemos buscarlos entre los genes que codifican para proteínas que actúan a nivel de la transcripción en el núcleo. Por ejemplo los genes *myc* o el *myb* serían posibles candidatos.

M. DÓMINE: ¿No sería *c-myc* un gen-respuesta? Lo digo porque con unos genes actúa en la proliferación y cuando colabora, por ejemplo, con P53, puede actuar en la apoptosis.

J. LEÓN: De nuevo surge la cuestión. Cuando se observa que cualquier otro gen disminuye su material de expresión, la pregunta es si esto es un efecto o es una causa. Entonces, la respuesta depende del sistema celular que se está analizando.