

# ONCOGENES

Carlos Manso

Centro de Metabolismo e Endocrinologia — INIC. Faculdade de Medicina de Lisboa. 1600 Lisboa.

## RESUMO

Faz-se uma revisão dos aspectos fundamentais da carcinogénese vírica e química, chamando a atenção para o facto de ambas irem actuar pelo mesmo mecanismo, a mutação de um gene controlador do crescimento.

## SUMMARY

### Oncogenesis

The Author reviews for fundamental aspects of viral and chemical carcinogenesis, and calls attention to the fact that both mechanisms act through the same way: mutation of a gene which controls growth.

## CARCINOGENESE

São bem conhecidas três causas de indução de neoplasias: por produtos químicos (carcinogénios), por radiações e por vírus<sup>1</sup>. Desde que Ames demonstrou que os carcinogénios são mutagénios, podemos aceitar que na base do processo de indução de cancro se encontram processos de mutação genética.

Vejam os o processo de mutagénese induzida por vírus. Neste grupo temos a considerar vírus contendo ADN e vírus contendo apenas ARN, provavelmente os mais primitivos na evolução, também chamados retrovírus.

Um vírus ADN infecta uma célula, alcança o núcleo e aí o seu ADN funde-se com o do hospedeiro. O genoma deste passa a produzir dois tipos de proteínas, as específicas do hospedeiro e as resultantes da presença dos genes víricos, causando um desarranjo do controlo, que pode levar à proliferação maligna (Fig. 1).

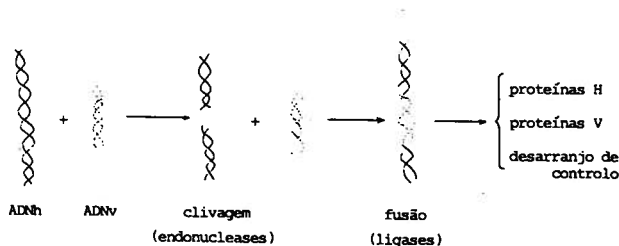


Figura 1 — Mecanismo de inserção do genoma de um vírus ADN no genoma do hospedeiro

Um retrovírus requer fases especiais: em primeiro lugar o ARN serve de modelo para o fabrico de ADN complementar (provírus), graças à presença de um enzima, a transcriptase reversa. O ADN é em seguida formado em duas faixas complementares, cujo número é amplificado. Segue-se o processo de inserção do ADN do vírus no genoma do hospedeiro (Fig. 2).

Os retrovírus foram inicialmente denominados oncornavírus (onco + RNA + vírus), em virtude de estarem associados à indução de neoplasias nos animais.

Existem diferenças entre as carcinogénese química e a carcinogénese vírica. Nesta última a resposta é directa, havendo uma transformação rápida das células infectadas. Pelo contrário, a carcinogénese química é um processo lento, devido em parte à presença de enzimas reparadoras do ADN, que permitem a substituição das bases alteradas. Além disso, existem alterações intermediárias, que regressam caso o estímulo carcinogénico cesse.

No homem a carcinogénese química é frequente, ao passo que a carcinogénese por vírus é rara, ou ainda mal conhecida.

## PROTOONCOGENES E ONCOGENES

Um problema largamente debatido em relação à causa do cancro foi o de saber se neste estava implicada fundamentalmente a alteração de controlos exteriores ao genoma (fenómeno epigenético) ou se, pelo contrário, era a alteração de um ou mais genes (oncogenes) que estava na base das anomalias da proliferação celular. Este problema está hoje esclarecido graças à técnica de transfectão, que consiste em introduzir no genoma de uma célula genes de outra célula.

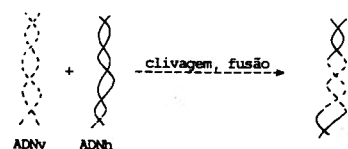
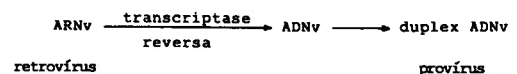


Figura 2 — Mecanismo de inserção do genoma de um retrovírus no genoma do hospedeiro

Consideremos uma cultura de fibroblastos, a que adicionamos 3-metilcolantreno (MC). As células em cultura transformam-se em pouco tempo em células fibrosarcomato-

sas. Isolando e purificando o ADN destas células, tornadas malignas por carcinogénese química, e introduzindo-o no genoma de fibroblastos normais, estes tornam-se também malignos, podendo o processo repetir-se.

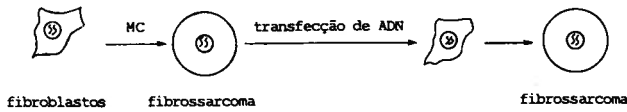


Figura 3 — Transfecção de ADN de fibroblastos sarcomatosos para fibroblastos normais

Estava assim demonstrado que a introdução de oncogenes em células normais causava a sua transformação maligna. Excluiu-se, pois, a causa epigenética, como iniciadora da neoplasia.

O MC actuaria sobre genes, alterando-os. O ADN codificaria o fenotipo da transformação induzida. Define-se protooncogene como um gene normal, que quando transformado, quer por compostos químicos, quer por vírus, origina um oncogene:

protooncogene = gene normal transformável

vírus  
drogas  
radiações

oncogene = gene alterado na sequência de bases → CA

Nos tempos que se seguiram procurou-se identificar quais os protooncogenes e quais os oncogenes que deles derivam. Rapidamente se chegou a duas conclusões curiosas:

- O número de protooncogenes é reduzido
- Os oncogenes víricos e os induzidos por compostos químicos são os mesmos. Utiliza-se a abreviatura c-onc para designar oncogenes celulares resultantes da mutação de um protooncogene por compostos químicos ou radiações e a abreviatura v-onc para os oncogenes víricos.

No Quadro 1 apresentamos uma lista de retrovírus e dos oncogenes neles identificados (v-onc). Cada oncogene vírico é abreviado em três letras (3).

QUADRO 1 — Oncogenes isolados de células infectadas por vírus

origem do retrovírus	oncogene vírico (v-onc)
Aves: Rous sarcoma virus	v-src
Y-73 sarcoma virus	v-yes
Avian myelocytoma virus	v-myc
Avian erythroblastosis virus	v-erb
Avian myeloblastosis virus	v-myb
Avian reticuloendoteliosis virus	v-rel
Murganho: Moloney sarcoma virus	v-mos
Abelson leukemia virus	v-abl
Harvey sarcoma virus	v-ras <sup>Ha</sup>
Kirsten sarcoma virus	v-ras <sup>Ki</sup>
FBJ osteosarcoma virus	v-fos
Felino: Feline sarcoma virus (GT-ST)	v-fes
Feline sarcoma virus (McDonough)	v-fms
Primata: Simian sarcoma virus	v-sis

## NATUREZA DOS PROTOONCOGENES

Os protooncogenes são genes altamente preservados na evolução das espécies. Há uma alta fidelidade de conservação da sua mensagem genética, ao longo da evolução dos vertebrados, incluindo mesmo alguns invertebrados. Eles parecem constituir uma família de genes altamente colocados hierarquicamente, desempenhando funções críticas, e a mínima alteração causa graves transtornos nos processos de divisão celular.

Alguns protooncogenes apenas parecem activos no desenvolvimento embrionário, contendo a mensagem para a produção de factores de crescimento embrionário e tornam-se quiescentes mais tarde. Uma célula normal contém protooncogenes, de cuja mutação somática pode resultar a sua expressão em tempo inapropriado, ou em excesso, ou de forma anormal. Os mecanismos de mutação somática podem resultar de amplificação genética, de mutação pontual ou de transposição de bases.

## MENSAGENS DOS PROTOONCOGENES

À medida que foi possível saber quais as proteínas cuja mensagem genética estava codificada nos protooncogenes verificou-se que eram relativamente poucas: tirosina quinases e seus receptores, factores de crescimento, proteínas reguladoras da formação de nucleótidos cíclicos e algumas proteínas nucleares (4). Estão resumidas no Quadro 2.

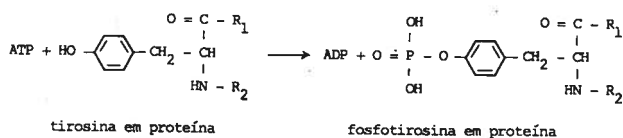
QUADRO 2 — Proteínas cuja mensagem genética é codificada por protooncogenes

proteínas	oncogenes	função	localização
	src		
	yes		
tirosina-quinase	fgr	proteínas quinases	membrana celular
	abl	específicas para	citoplasma
	fps	tirosina (Tpr K)	citossqueleto
	fes		
	ros		
	erb B		
factores de crescimento e seus receptores	fms		membrana celular
	ml		
	raf	activam Tpr K	outras membranas
	mos		citoplasma
	sis		
proteínas reguladoras de nucleótidos cíclicos	H-ras		
	Ki-ras	união de GTP	membrana celular
	N-ras		
proteínas nucleares	fos		
	myc		
	myb	?	núcleo
	B-lym		
	ski		
	rel		
?	erb A	?	?
	ets		

## A. PROTEÍNA-QUINASES

Um conjunto de protooncogenes contém a mensagem para proteína-quinases específicas para tirosina. Estes enzimas

catalisam a fosforilação de um resíduo de tirosina de uma proteína de acordo com a seguinte equação:



Já se conheciam proteína-quinases que fosforilavam resíduos de serina ou de treonina em proteínas, activando-as ou inibindo-as; porém, o conhecimento de tirosina-proteína-quinases é mais recente. A primeira identificada foi a p 60 src de células infectadas pelo vírus do sarcoma de Rous e pouco depois foi identificada a p 120 abl do vírus da leucémia do murganho. Mais tarde foram identificadas em células normais.

Uma dificuldade encontrada foi a escassez de proteínas fosforiladas. Com efeito, no fibroblasto a activação de proteína-quinases origina fosforilação de 90% de resíduos serina e de 10% de resíduos treonina, mas apenas é possível fosforilar 0,03% de resíduos de tirosina. É de notar que em células infectadas por retrovírus a fosforilação de resíduos de tirosina aumenta 10 vezes.

Procurou-se então saber que proteínas eram fosforiladas em resíduos de tirosina e qual a consequência:

- 1) Três enzimas da glicólise (enolase, desidrogenase láctica e fosfoglucomutase) o que parece insuficiente para explicar o aumento de glicólise nos tumores.
- 2) Vinculina — é uma proteína do citoesqueleto, de PM = 130.000; a sua acção parece consistir em unir os filamentos de actina a uma proteína de membrana. A fosforilação da vinculina reduz a sua capacidade de interligação, causando desorganização intracelular e alteração da forma da célula.
- 3) Proteína p 36 — está associada à face interna da membrana celular e tem uma função estrutural, que é afectada por fosforilação.
- 4) Proteína p 42 — esta proteína é fosforilada em resposta a numerosos estímulos mitogénicos, admitindo-se que desempenhe um papel importante na indução de mitose.
- 5) Fosfatidil-inositol da membrana — pode ser fosforilado pela proteína p 60 src, acelerando a sua clivagem. Os produtos desta clivagem são activadores de outros processo metabólicos.

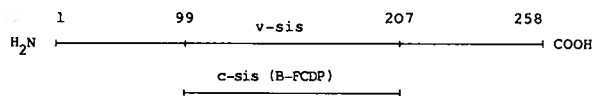
Finalmente, convém mencionar que foram detectadas diferenças na sequência de aminoácidos entre as tirosina pr K induzidas por oncogenes e as presentes em células normais. É, pois, possível que elas sejam causadoras de fosforilação anormal, responsável por desregulação metabólica ou da actividade mitogénica. 5,6

## B. FACTORES DE CRESCIMENTO E SEUS RECEPTORES

No segundo grupo de oncogenes temos a considerar os que contêm mensagens para proteínas que funcionam estimulando os sistemas de crescimento. Estão especialmente bem estudados os oncogenes v-sis e v-erb B. O primeiro codifica uma proteína análoga ao factor de crescimento derivado das plaquetas (FCDP) e o segundo tem a mensagem para uma forma truncada de receptor do factor de crescimento epidérmico (FCE).

O FCDP é constituído por duas cadeias peptídicas A e B semelhantes, havendo dúvidas sobre se elas formam um dímero unido por uma ponte S-S ou se actuam isoladas. No porco só existe a proteína B.

O oncogene v-sis é formado por um péptido com 258 aminoácidos ao passo que a cadeia B do FCDP é homóloga à sequência 99-207 do primeiro, diferindo apenas em 3 resíduos:



O FCDP encontra-se nos grânulos  $\alpha$  das plaquetas e, quando libertado, vai actuar sobre as células contendo receptores específicos. É um potente mitogénico, estimulando a migração e produção de células no local de lesão vascular (hormona das feridas). Também parece desempenhar um papel na aterosclerose. Ele liga-se a receptores de alta afinidade, é internalizado e degradado nos lisosomas. O seu receptor está associado a uma tirosina pr K (tal como o FCE, a insulina e o factor de crescimento insulínico I).

Vemos, pois, que, em condições normais, o FCDP é libertado das plaquetas, circula até à célula alvo, a que se liga exogenamente, produzindo um estímulo mitogénico intermitente. Contudo, no caso do oncogene v-sis, o análogo ao FCDP é produzido no interior da célula e vai estimular o receptor de um modo contínuo, originando um estímulo mitogénico constante, que leva à proliferação desordenada.

Existe um órgão, a placenta, que produz FCDP e tem receptores para ele, o que explica o seu crescimento rápido.

Nas células normais o FCDP estimula a produção de dois outros factores, os factores de transformação  $\alpha$  e  $\beta$  (FT $\alpha$  e FT $\beta$ ), e activa ainda outros proto-oncogenes (c-myc e c-fos), originando um fenotipo transformado reversível.

O caso do oncogene v-erb é mais estranho e difícil de interpretar. Ele codifica uma versão truncada do receptor para o FCE. O FCE tem 1186 aminoácidos, dos quais cerca de metade detro da célula e a outra metade, fortemente glicosilada, fora da célula. O produto de v-erb contém os resíduos 554-1154 da parte intracelular do receptor do FCE com 96% de homologia. Esta forma incompleta do receptor de FCE está activada continuamente, fosforilando resíduos de tirosina de proteínas dum modo contínuo, e activando a mitogénese.

Mais recentemente descobriram-se outros oncogenes derivados de receptores para factores de crescimento: o v-fms é também semelhante ao receptor de FCE e o seu homólogo c-fms foi identificado como receptor do factor de crescimento das células mielóides.

Um outro oncogene recentemente descoberto, neu, detectado em neuro/glioblastomas do rato, parece codificar o receptor do FCDP.

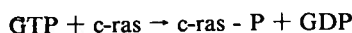
Vejam agora o problema dos factores de transformação. O FT $\alpha$  é um polipéptido de 50 aminoácidos que actua sobre os receptores do FCE, com o qual tem uma homologia de cerca de 40%. A sua acção apenas foi documentada em células tumorais ou transformadas por vírus. É possível que o FT $\alpha$  tenha um papel na embriogénese e possivelmente na regeneração tissular, ao passo que o FCE tenha um papel endócrino no adulto.

O FT $\beta$ , pelo contrário, existe no adulto, sendo particularmente abundante nas plaquetas (1500 moléculas/plaqueta). Parece ter um papel na cicatrização de feridas. Pensa-se que tenha um receptor próprio, pois não se liga a outros.

A entrada de fibroblastos no ciclo mitótico requer a acção coordenada de 3 FC (FCDP, FCE e FCI). Também para induzir a sua transformação maligna por FT a presença dos três FC é requerida. <sup>9, 14</sup>

### C. PROTEÍNAS REGULADORAS DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS

Os oncogenes ras codificam uma proteína p 21 de PM = 21 000 que catalisa a sua própria fosforilação num resíduo de treonina, mas não fosforila outras proteínas. É, pois, uma autokinase dependente de GTP:

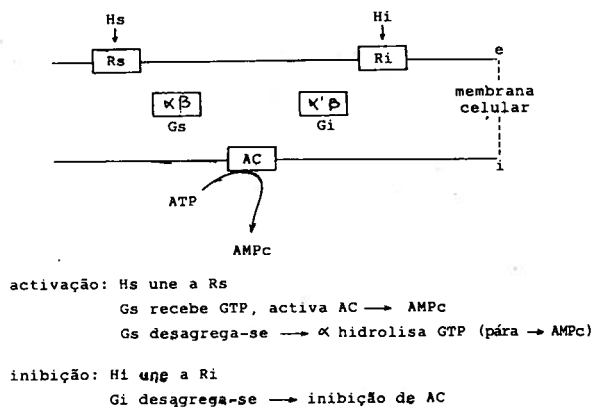


Esta função de GTPase está reduzida para 1/5 de actividade no caso da proteína codificada por v-ras, o que faz pensar que a proteína v-ras mantenha um sinal contínuo.

Vejamos em que consiste este sinal. Para o compreender vamos fazer uma curta descrição do papel das proteínas G como reguladoras da formação de nucleótidos cíclicos.

Diversas hormonas (adrenalina, glucagina, p.e.) exercem os seus efeitos através da formação de um segundo mensageiro intracelular, usualmente o AMP cíclico. Todavia, o sistema é mais complexo e podemos considerar o esquema da Figura 4 como uma aproximação simplificada.

Figura 4 — Controlo da formação de AMP cíclico pelas proteínas G



Consideremos na membrana dois receptores Rs e Hi, o primeiro estimulador, o segundo inibidor da adenil-ciclase (AC). Notamos ainda, na face interna da membrana a presença de duas proteínas G (Gs e Gi) formadas duas subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo as diferente de  $\alpha$  ( $\alpha'$ ) e a subunidade  $\beta$  idêntica.

Quando uma hormona estimuladora se une a Rs, esta activa Gs, que recebe uma molécula de GTP na subunidade  $\alpha$ . Esta dissocia-se de  $\beta$  e activa a adenil-ciclase. A recombinação da subunidade  $\alpha$  com a subunidade  $\beta$  estimula a actividade GTPase de  $\alpha$ . O GTP é hidrolisado e cessa o estímulo para a activação da adenil-ciclase.

Quando uma hormona inibidora se une ao receptor inibidor dá-se a dissociação das subunidades  $\alpha'$  e  $\beta$ , indo  $\beta$  unir-se à subunidade  $\alpha$  activadora e estimular a degradação do GTP.

Entre as proteínas G encontra-se a transducina, no segmento externo dos bastonetes da retina, que converte o estímulo luminoso em variação de polarização da membrana. Um fotão isomeriza a rodopsina, que permuta GDP com GTP. O complexo [GTP-transducina] dissocia da rodopsina, reage com a fosfodiesterase e esta hidrolisa GMP cíclico. O GTP é hidrolisado pela actividade fosfatásica e acaba o ciclo visual, pois cessa a activação da fosfodiesterase e a transducina reassocia com a rodopsina.

A subunidade  $\alpha$  foi analisada. Tem 350 aminoácidos, com sequências homólogas aos produtos dos oncogenes ras, em especial as sequências que unem GTP e as que têm actividade GTPase.

Há razões para pensar que entre as acções do AMP cíclico se encontrem sinais mitogénicos. Demonstrou-se que ele activa a gene da prolactina e os genes da desidrogenase láctica, transaminase da tirosina e fosfoenol piruvato carboxiquinase; fosforila proteínas da cromatina e proteínas ribosómicas.

As proteína-quinases activadas pelo AMPc actuam sobre componentes do citosqueleto. É, pois, compreensível que uma alteração do proto-oncogene ras, de que resulte modificação da capacidade GTPase da subunidade  $\alpha$  da proteína G, tenha a ver com o controlo da actividade mitótica da célula.

A administração de p 21 a culturas de células por micro-injecção origina perda de controlo de crescimento em poucas horas. Contudo, a micro-injecção de um anticorpo específico para a proteína p 21 causa a reversão para o fenotipo normal.

Os mutantes da proteína ras têm uma actividade GTPase de 1/10 do normal, pelo que a formação de AMPc está muito aumentada e, em resultado, os sinais mitogénicos.

A família de oncogenes ras é composta por três membros: Harvey, Kirsten e N. O N-ras está activo em tumores hematopoiéticos (leucémias, linfoma de Burkitt, neuroblastoma, sarcomas, carcinoma do cólon) ao passo que os H-ras e K-ras estão activos em tumores humanos (cancro da bexiga, pulmão, cólon, pâncreas, sarcomas, tumores hematopoiéticos, neuroblastomas) e de animais (neuroblastomas do rato, cancro da bexiga do murganho). Os oncogenes ras diferem do proto-oncogene apenas na mensagem de um nucleótido e todos eles especificam a proteína p 21 que difere do normal no aminoácido 12 ou no 26. São detectados em 20 a 30% dos tumores humanos.

Em condições normais a actividade do proto-oncogene ras é mínima ou nula, como o parece confirmar um estudo realizado sobre a metilação do gene da albumina e da proteína ras em hepatocitos normais. Comparando o estado de metilação do gene da albumina e do gene ras em hepatocitos e em células não parenquimatosas do fígado, verifica-se que o gene da albumina está hipometilado (activo) no hepatocito e hipermetilado (inactivo) nas restantes células, ao passo que o gene ras está hipermetilado em todas. <sup>1, 5, 2, 4</sup>

### D. PROTEÍNAS NUCLEARES

Como vimos, alguns oncogenes codificam proteínas nucleares (myc, fos, myb, B-lym, ski) sobre as quais se sabe muito pouco. Já vimos que o FCDP activa os oncogenes myc e fos, o que significa que um fenómeno de membrana celular pode formar um sinal que chega ao núcleo.

O oncogene mais bem estudado é o myc, cujo gene é transcrito num ARN contendo três exons e dois introns, porém, a proteína apenas é codificada pelo 2.º e 3.º exon. A proteína produzida a partir do oncogene myc existe na matriz nuclear, mas ignora-se a sua função.

Em culturas de células de neuroblastomas, a expressão de c-myc como ARN mensageiro está aumentada. Este facto resulta por um lado do aumento do número de cópias do gene, por outro da sua maior actividade. A activação parece ser o primeiro fenómeno, ao passo que o aumento do número de cópias parece um fenómeno posterior devido à progressão do tumor.

O oncogene myc também aparece expresso noutros tumores (retinoblastoma, carcinomas neuro-endócrinos). A sua actividade é reduzida por interferon nalgumas linhagens de células tumorais, porém, outras são resistentes.

Grande interesse teve a descoberta do envolvimento do oncogene c-myc translocado no linfoma de Burkitt. O oncogene c-myc encontra-se na extremidade do braço longo do cromossoma 8, ao passo que os genes para as cadeias pesadas das imunoglobulinas se encontram no cromossoma 14. Uma

translocação recíproca entre as extremidades destes cromossomas aparece neste linfoma. Admite-se que no cromossoma 14 existem enhancers (estimuladores) e que a união de c-myc a um enhancer tenha como consequência o seu estímulo contínuo.

Noutros casos de linfoma de Burkitt, há translocações recíprocas entre o cromossoma 8 e os cromossomas 2 ou 22, locais de síntese das cadeias leves (16% translocações 8/22, 9% 8/2, nos restantes 8/14).

Dado que o gene c-myc é expresso a baixo nível na maioria dos tecidos, excepto nos hematopoiéticos (bolsa de Fabricio, timo, baço, medula óssea, célula T e B) admite-se que tenha um papel no crescimento ou diferenciação das células hematopoiéticas.

## LOCALIZAÇÃO CROMOSSÓMICA DOS PROTO-ONCOGENES

A localização da maior parte dos proto-oncogenes está hoje determinada. O seu conhecimento tem interesse na medida em que pode explicar o aparecimento de tumores quando um proto-oncogene é translocado para junto de uma zona de outro cromossoma que o possa estimular. Grande número de situações deste tipo começam a ser detectadas e têm interesse futuro na compreensão de fenómenos genéticos ligados com o cancro e na identificação de certos tipos de tumores. O Quadro 3 apresenta uma lista de distribuição de oncogenes.

QUADRO 3 — Localização de proto-oncogenes em cromossomas humanos

cromossomas*	oncogenes
1 p	B-lym, N-ras
2 p	N-myc
3 p	raf-1
5 q	fms
6 q	myb
7 p	erb-B
8 q	mos, myc
9 q	abl
11 p	H-ras
12 p	K-ras
15 q	fes
17 q	erb-A
18 q	bcl
20 q	src
22 q	sis

\* p - braço curto

q - braço longo

## DISCUSSÃO

Os trabalhos destes últimos anos permitiram concluir que a causa do cancro consiste em pequenas mutações de alguns genes estrategicamente colocados. Estes genes podem ser da própria célula ou nela introduzidos por vírus que contêm versões semelhantes. A característica comum é a sua função reguladora do crescimento. Com efeito, parece haver uma sequência de acção nas proteínas por eles codificadas, quer sejam factores de crescimento, quinases reguladoras de proteínas, proteínas controladoras da formação de AMP cíclico, ou proteínas nucleares, elas têm de comum o controlo da mitogénese.

A conservação destes genes ao longo da evolução das espécies faz pensar que qualquer experiência da Natureza, tentando modificá-los, seria acompanhada de tão graves alterações do controlo do crescimento, que inviabilizaria qualquer organismo pluricelular.

Certamente mais alguns oncogenes virão a ser descritos nos próximos tempos, no entanto, é pouco provável que o conceito actual do seu mecanismo de acção sofra modificações importantes.

## BIBLIOGRAFIA

1. NEINHUIS, A. — Genetic mechanisms in neoplasia. *Blood* 64: 949, 1984.
2. WEINBERG, R. — Oncogenes of human tumor cells. *TIBS* 7: 136, 1982.
3. SLAMON, D., KERNION, J., VERMA, I., CLINE, M. — Expression of cellular oncogenes in human malignancies. *Science* 224: 256, 1984.
4. HUNTER, T. — The proteins of oncogenes. *Sc American* 251: 60, 1984.
5. DEUEL, T., HUANG, J. — Roles of growth factor activities in oncogenesis. *Blood* 64: 951, 1984.
6. HUNTER, T., GOULD, K., COOPER, J. — Tyrosine protein kinases, viral transformation and the control of cell proliferation. *Royal Soc. Trans* 12: 757, 1984.
7. HUNTER, T. — Oncogenes and growth control. *TIBS* 10: 275, 1985.
8. LEE, D., ROSE, T., WEBB, N., TODARO, G. — Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- $\alpha$ . *Nature* 313: 489, 1985.
9. NIMAN, H., HOUGHTON, R., POPE, D. — Detection of high molecular weight forms of platelet derived growth factor by sequence specific antisera. *Science* 226: 701, 1984.
10. PFEFFER, S., ULLRICH, A. — Epidermal growth factor: is the precursor a receptor? *Nature* 313: 184, 1985.
11. COCHRAN, B., ZULLO, J., VERMA, I., STILES, C. — Expression of c-fos gene is stimulated by platelet derived growth factor. *Science* 226: 1080, 1984.
12. BROWN, J., TWARDZIK, D., MARQUARDT, H., TODARO, G. — Vaccinia virus encodes a polypeptide homologous to epidermal growth factor and transforming growth factor. *Nature* 313: 491, 1985.
13. MASSAGNÉ, J. — The transforming growth factors. *TIBS* 10: 237, 1985.
14. EK, B., RONNSTRAND, L., HELDIN, K. — Stimulation of tyrosine phosphorylation by platelet derived growth factor.
15. FLIER, J., UNDERHILL, L. — Clinical implications of quinone-nucleotide-binding proteins as receptor-effector couplers. *New Engl. J. Med.* 312: 26, 1985.
16. LEFKOWITZ, R., CARON, M., STILES, G. — Mechanisms membrane receptor regulation. *New Engl. J. Med.* 310: 1570, 1984.
17. TANABE, T., NUKADA, T. — Primary structure of the  $\alpha$ -subunit of transducin and its relationship to ras proteins. *Nature* 315: 243, 1985.
18. GANCEDO, J., MAZON, M., ERASO, P. — Biological roles of cAMP: similarities and differences between organisms. *TIBS* 10: 210, 1985.
19. RASENICK, M., STEIN, P., BITENSKY, M.: The regulatory subunit of adenylate cyclase interacts with cytoskeletal components. *Nature* 294: 560, 1961.
20. KONDRASHIN, A. — Cyclic AMP and regulation of gene expression. *TIBS* 10: 97, 1985.
21. FERAMISCO, J., CLARK, R., WONG, G., ARNHEIM, N., MILLEY, R., McCORMICK, F. — Transient reversion of ras oncogene-induced cell transformation by antibodies specific for aminoacid 12 of ras protein. *Nature* 314: 639, 1985.
22. WEINBERG, R., — ras Oncogenes and the molecular mechanisms of carcinogenesis. *Blood* 64: 1143, 1984.
23. SANTOS, S., PULCIANI, S., BARBACID, M. — Characterization of a human transforming gene isolated from T-24 bladder carcinoma cells. *Fed. Proc.* 43: 2280, 1984.
24. VORCE, R., GOODMAN, J. — Methylation of the serum albumin

- min gene as compared to the K-ras oncogene in hepatocytes and non-parenchymal cells of rat liver. *Biochem Biophys Res. Com.* 126: 879, 1985.
25. THOMPSON, C., CHALLONER, P., NEIMAN, P., GROUDINE, M. — Levels of c-myc oncogene m-RNA are invariant through out the cell cycle. *Nature* 314: 363, 1985.
  26. ROBERTS, A., ROCHE, N., SPORN, M. — Selective inhybition of the anchorage independent growth of my-transfected fibroblasts by retinoic acid. *Nature* 315: 238, 1985.
  27. FEO, S., RUSHDI, A. — Suppression of the normal mouse c-myc oncogene in human lymphoma cells. *Nature* 315: 493, 1985.
  28. EINAT, M., RESNITZKI, D., KIMCHI, A. — Close link between reduction of c-myc expression by interferon and G<sup>0</sup>/G<sup>1</sup> arrest. *Nature* 313: 598, 1985.
  29. KOHL, N., GEE, C., ALT, F. — Activated expression of the N-myc gene in human neuroblastomas and related tumors. *Sciences* 226: 1335, 1984.
  30. CROCE, C., KLEIN, G. — Chromosome translocations and human cancer. *Sc. American* 252: 44, 1985.
  31. PEARSON, M., ROWLEY, J. — The relation of oncogenesis and cytogenetics in leukemia and lymphoma. *Ann. Rev. Med.* 36: 471, 1985.
  32. YUNIS, G., SORENG, L. — Constitutive fragile sites and cancer. *Science* 226: 1199, 1984.
- Pedido de separatas: Carlos Manso  
Centro de Metabolismo e Endocrinologia — INIC  
Faculdade de Medicina de Lisboa  
1600 Lisboa. Portugal