

Revisión

El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica

P.A. MARTÍNEZ-CARPIO

Departamento de Biología Celular y Fisiología. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Barcelona. Hospital Universitario Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. España.

Los factores de crecimiento celular representan una potente línea de investigación tanto en el dominio bioquímico como en el endocrinológico, y algunos ya son imprescindibles en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de ciertas enfermedades. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) destaca entre los más estudiados. Cuarenta años después de su descubrimiento, sus principales aportaciones continúan en el campo oncológico, pero destacan numerosos trabajos en muchas otras especialidades médicas. Esta revisión se centra en los aspectos bioquímicos, moleculares y celulares del EGF, resume las aplicaciones clínicas más relevantes y orienta el camino de las investigaciones futuras.

EPIDERMAL GROWTH FACTOR FORTY YEARS AFTER ITS DISCOVERY: FROM BIOCHEMISTRY TO CLINICAL APPLICATIONS

The study of growth factors is an important line of investigation in the biomedical and endocrinological fields. Some growth factors are crucial in the diagnosis, prognosis and therapy of certain diseases. Epidermal growth factor (EGF) is among the most studied of these factors. Forty years after its discovery, it is especially important in oncology although studies have been published in numerous medical specialties. This review focuses on the biomedical, molecular and cellular aspects of EGF, summarizes its most important clinical applications, and suggests future investigations.

Key words: Growth factors EGF

Los factores de crecimiento relacionan a la célula con su medio externo (extracelular) y son capaces de modificar características tanto de la propia célula que los sintetiza como de células vecinas de distinta estirpe, participando en regulaciones autocrinas, yuxtacrinas e intracrinas. Entre los más estudiados destacan el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor transformante del crecimiento- α (TGF- α), el factor transformante del crecimiento- β (TGF- β), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), las interleucinas 2 y 3 (IL-2, IL-3), los factores de crecimiento insulinoide tipos I y II (IGF-I, IGF-II), la somatostatina, los factores de crecimiento fibroblástico (FGF) y algunos otros. En el ser humano, el ciclo y la proliferación celular dependen de la interacción de varios de estos factores, que también tienen muchas otras funciones, como controlar la migración, la diferenciación y la actividad metabólica de la células. Algunos son ubicuos e imprescindibles para la supervivencia de cualquier célula y pueden medirse en el suero a concentraciones muy bajas (del orden de 10^{-9} a 10^{-11} M). Los mecanismos bioquímicos implicados parecen ser ancestrales porque mantienen intactas desde hace millones de años unas bases que han sido imprescindibles para perpetuar el fenómeno vital hasta el día de hoy.

Palabras clave: Factores de crecimiento. EGF.

Correspondencia: Dr. P. A. Martínez-Carpio.
Gran Via de les Corts Catalanes. 275, 3.º-8.ª izq. 08014 Barcelona. España.

Manuscrito recibido el 17-2-2003; aceptado para su publicación el 21-5-2003.

Se considera que estos factores acaban modificando la expresión de genes específicos tras complejas reacciones intracelulares que incluyen procesos de fosforilación en cadena sobre proteínas. Los resultados de la investigación básica han trascendido a la realidad clínica en diversos campos médicos. El endocrinólogo es uno de los principales expertos en la bioquímica, fisiología y clínica de estas moléculas, con amplia experiencia sobre otros factores. Por ejemplo, en los enanismos por déficit de receptores para la somatotropina uno de los tratamientos clave continúa siendo el IGF-I, donde la administración sistémica del factor parece además incrementar la masa ósea. A diferencia de otros factores de este tipo, el EGF ha tenido una repercusión mucho más amplia en otros campos y no existen revisiones en lengua castellana que traten a fondo los aspectos bioquímicos y clínicos de este factor. Esta revisión pretende acercar al endocrinólogo las principales características del EGF en los aspectos molecular, celular, fisiológico y clínico.

BIOQUÍMICA, FISIOLÓGIA Y FISIOPATOLOGÍA CELULAR DEL EGF

Descubrimiento del factor y moléculas relacionadas

El EGF fue descubierto en 1962 por los doctores Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini en la glándula submaxilar de ratón. Cuando este factor, extraído de dicha glándula, se inyectaba al ratón recién nacido, se producía una apertura precoz de los párpados y una erupción prematura de los incisivos. El análisis histopatológico de los párpados mostraba una hiperplasia y queratinización de la epidermis, motivo por el cual se le denominó *factor de crecimiento epidérmico*¹.

Cuarenta años después de este descubrimiento se ha profundizado en el conocimiento de su actuación sobre la célula, se ha clonado y caracterizado su receptor de membrana (EGFR) y se ha descrito una compleja cascada de señales intracelulares generadas al interactuar el ligando con el receptor, de modo que mecanismos moleculares descubiertos para el EGF han sido útiles para estudiar procesos celulares básicos relacionados con hormonas y otros polipéptidos. Los trabajos pioneros del Dr. Cohen han generado importantísimos avances en el conocimiento del fisiologismo celular, y las evidencias del momento indican que en los próximos años se continuará en la misma línea. Cohen recibió el premio Nobel de Medicina en 1986 en reconocimiento a la trascendencia que supuso ya en las décadas de 1970 y 1980 el descubrimiento de esta molécula². Se trata de un polipéptido de 53 aminoácidos que mantiene su estructura tridimensional gracias a tres puentes disulfuro, y el gen que lo codifica se encuentra en el cromosoma 4³. Sus principales lugares de síntesis son las glándulas salivares y el riñón⁴, pero se ha detectado actividad transcripcional (EGF mRNA) en células mamarias, páncreas, intestino del-

gado y otros muchos tejidos, y se ha cuantificado por métodos inmunoquímicos en la mayoría de fluidos biológicos y en el plasma⁵.

El EGF forma parte de una familia de péptidos relacionados, como el TGF- α , la anfirregulina y el HB-EGF (o factor similar al EGF que se une a la heparina). Todos ellos se caracterizan por tener una secuencia homóloga, unirse al mismo receptor (EGFR) y llevar a cabo funciones biológicas similares. Esta familia de factores se sintetizan como propéptidos integrados en la membrana plasmática, con un dominio citoplasmático, una secuencia de transmembrana y un dominio extracelular, que contiene la secuencia del péptido maduro y que es liberado al medio por escisión proteolítica⁶. La estructura madura de todos los péptidos relacionados con el EGF presentan una total conservación de 6 posiciones de cisteína que contribuyen al mantenimiento de la estructura terciaria de la proteína mediante la formación de 3 puentes disulfuro, condición *sine qua non* para definir al péptido como miembro de la familia del EGF⁷.

Expresión, secreción y regulación

En los mamíferos y en el hombre, una gran variedad de tejidos de toda la economía sintetizan y liberan EGF al medio extracelular. Uno de los modelos más estudiados ha sido el ratón, en el cual se ha detectado mRNA de pro-EGF, desde el punto de vista cuantitativo y en orden decreciente, en glándula salival de ratón macho, glándula salival de ratón hembra, riñón, glándula mamaria, páncreas, duodeno, hipófisis, cerebro, pulmón, bazo, ovarios, hígado y ojo⁴. Hasta hace poco no se conocían bien los mecanismos de síntesis y secreción del EGF al medio extracelular. En la glándula mamaria diversos trabajos indicaban que el EGF se sintetizaba como una prohormona (pro-EGF) que quedaba unida a la membrana celular y que posiblemente, por acción de diferentes proteasas localizadas en la misma membrana, se liberaría al medio extracelular⁸. Actualmente se acepta que el gen del EGF (120 kilobases en el cromosoma 4) se traduce en un precursor de transmembrana de 1.217 aminoácidos y que la secuencia del EGF maduro (53 aminoácidos) es liberada mediante un proceso proteolítico que es común con el que sucede en las moléculas precursoras de otros miembros de la familia, como el TGF- α . Esta proteólisis es relativamente lenta y consta de dos etapas; primero se produce una escisión sobre los residuos de alanina o valina más próximos al extremo carboxiterminal del péptido maduro⁹, y luego una segunda proteólisis sobre un residuo de valina del extremo carboxiterminal de la cadena intracitoplasmática, que se supone permitiría un control intracelular sobre la liberación del EGF maduro al medio¹⁰.

La identidad de las enzimas implicadas en este proceso y la regulación del mismo todavía no se ha determinado con exactitud. Sólo se sabe que tales escisiones requieren adenosintrifosfato (ATP) y que podrían

dependen de vías de señalización relacionadas con la proteína G y la proteincinasa C^{8,11,12}. Estos mecanismos proteolíticos escisores de las formas maduras son comunes a diferentes precursores de la familia del EGF, pero han sido sobre todo estudiados para el TGF- α . En este último caso no se conoce bien hasta qué punto estos procesos pueden influir en su bioactividad, pues se han encontrado moléculas de TGF- α de diferentes tamaños (entre 5 y 30 kD) que reflejan diferentes puntos de escisión, y aunque las formas de alto peso molecular pueden unirse al EGFR, la relevancia funcional que pueden tener desde el punto de vista de su actividad biológica parece controvertida^{10,13}. A esto se añade la circunstancia de que el pro-EGF contiene en su molécula siete regiones ricas en cisteína que presenta homología de secuencia con el EGF maduro que oscilan entre el 20 y el 40%¹⁴.

Receptor del EGF (EGFR)

Es una glucoproteína de transmembrana de 170 kD, formada por una cadena aminoacídica única codificada por un gen localizado en el cromosoma 7 (7q2), con un dominio en la superficie celular (extracelular), rico en hidratos de carbono, que es el que se une al ligando, un dominio único hidrofóbico de transmembrana y un dominio citoplasmático con actividad tirosincinasa, donde se encuentran los lugares de autofosforilación. El principal requerimiento de la célula para que responda al EGF es, como resulta obvio, que posea receptores para el factor (EGFR). En mamíferos, la gran mayoría de células poseen EGFR, a excepción de algunas células sanguíneas diferenciadas de la serie blanca. El estudio del EGFR supuso un enorme adelanto en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la transducción de la señal de los receptores tirosincinasa, un grupo de complicadas moléculas con peculiaridades bien estudiadas, muy extendidas en nuestro organismo, y que utilizan también muchos otros factores de crecimiento (PDGF, FGF, IGF-I, NGF, etc.)¹⁵.

La unión del ligando al receptor inicia un complejo programa de activación, incrementándose el calcio citosólico y, finalmente, la síntesis de ADN y el crecimiento y proliferación celular. En el caso concreto del EGF, cuando se une al dominio extracelular del receptor, se activa el dominio intracelular con actividad tirosincinasa. Una vez activado, el receptor transfiere un grupo fosfato del ATP a determinadas cadenas laterales de tirosina, tanto de la propia proteína receptora como de otras proteínas celulares determinadas. Hasta hace poco no quedaba claro de qué forma la unión del ligando al dominio extracelular activaba el dominio catalítico intracelular, situado al otro lado de la membrana. El problema quedó resuelto cuando se demostró que la unión del ligando hace que el EGFR forme dímeros, lo cual permite a los dos dominios citoplasmáticos fosforilarse uno al otro sobre varios residuos de tirosina. Esta fosforilación cruzada se denomina

autofosforilación porque se produce dentro del receptor dimerico. Es decir, parece que el EGF induce un cambio conformacional en el dominio extracelular que, a su vez, induce la dimerización del receptor.

Las tirosinas fosforiladas son lugares de unión de alta afinidad para proteínas señal intracelulares de la célula diana. Cada una de estas proteínas se une a diferentes lugares fosforilados del receptor activado, reconociendo, además de la fosfotirosina, determinadas características del entorno de la cadena polipeptídica. Una vez se han unido al receptor, muchas de estas proteínas resultan fosforiladas sobre tirosinas, y son así activadas. De esta forma se cree que la autofosforilación de tirosinas actúa como una especie de interruptor que desencadena el ensamblaje transitorio de una compleja señalización intracelular^{2,15,16}.

Se conocen algunas de las proteínas señal intracelulares que se unen a las fosfotirosinas de los receptores tirosincinasa activados, como por ejemplo la proteína activadora de la GTPasa (GAP, de *GTPase-activating protein*), entre otras. Estas proteínas tienen en común el presentar dominios SH₂, que reconocen las tirosinas fosforiladas y permiten a las proteínas que los presentan unirse a los receptores tirosincinasa activados, así como a otras proteínas señal intracelulares que hayan sido fosforiladas transitoriamente sobre tirosinas. Por otra parte, las proteínas Ras constituyen un eslabón crucial en la cascada intracelular de señalización activada por receptores proteincinasa hasta el núcleo, estimulando la proliferación y/o diferenciación celular. Estas proteínas Ras fueron descubiertas como los productos hiperactivos de genes *ras* mutantes, que producen cáncer al romper los controles normales sobre la proliferación de la célula. Alrededor del 30% de cánceres humanos presentan estas mutaciones en un gen *ras*. Las proteínas Ras se activan cuando se unen a GTP y se inactivan cuando se unen a GDP^{15,16}.

Los procesos de fosforilación de tirosina son muy rápidos, y por ello estos cortos eventos señal deben convertirse en señales más duraderas. Esto se consigue a través de fosforilaciones en residuos de serina y treonina, en que intervienen las denominadas proteincinasas activadas por mitógenos (MAP, de *mitogen activated proteins*). Cuando la MAP-cinasa se encuentra activada fosforila algunas proteínas reguladoras de genes. A menudo, en cuestión de minutos después de que la célula haya sido estimulada por un factor de crecimiento, se activa la transcripción de un conjunto de genes tempranos inmediatos^{2,15,16}. Cuando el EGF se une a su receptor, se internaliza el complejo y ambos son degradados en los lisosomas¹⁷, lo que conlleva un descenso en la concentración de los receptores de EGF en la superficie celular. Como resultado, la concentración del ligando señal en el medio extracelular regula el número de moléculas de receptor complementario en la superficie de la célula diana^{16,17}.

Se conocen también otros receptores relacionados con el EGFR: el c-erbB2, el c-erbB3 y el c-erbB4, aunque todavía no se sabe *at totum* los ligandos que se

unen a estos receptores y la afinidad con que lo hacen. Conviene recordar que el oncogén *erb B* codifica una forma truncada del receptor de EGF que tiene un dominio intracelular tirosincinasa que se halla continuamente activo. Las células que expresan este oncogén se comportan como si continuamente estuvieran estimuladas a proliferar por un factor de crecimiento. Se han detectado EGFR en tejidos mamarios normales y tumorales, así como en líneas celulares de cáncer de mama. La hiperexpresión del EGFR que se encuentra tanto en tejidos tumorales como en líneas celulares de cáncer de mama se relaciona de modo inverso al número de receptores estrogénicos en el mismo tumor. Esto se ha asociado a un peor pronóstico y menor supervivencia en el caso de cáncer de mama, entre otras cosas por la falta de respuesta a la terapia hormonal¹⁸.

Degradación receptosómica y bioactividad

Desde hace más de 20 años se sabe que la unión del EGF a su receptor ocasiona o facilita la formación de múltiples complejos EGF-EGFR en la superficie de la membrana¹⁹. Estos complejos EGF-EGFR son rápidamente internalizados por la célula, lo que implica una degradación del EGF dentro de las vesículas lisosomales y, a la vez, una regulación negativa sobre el número de receptores, ya que son eliminados de la superficie celular. Este proceso de endocitosis y degradación del EGF es una clara consecuencia de la unión del EGF al EGFR, pero parece que esto no influye necesariamente en la actividad biológica del EGF, pues algunos inhibidores de la degradación del EGF como la leupeptina no inhiben la respuesta mitogénica del EGF²⁰.

Lo que sí se ha sugerido, ya desde hace tiempo, es que sería necesaria una ocupación prolongada del receptor (de unas 8 h como mínimo) para que el EGF llevase a cabo su efecto mitogénico de modo plenamente efectivo, y por tanto el proceso de internalización, degradación y regulación negativa sobre los EGFR parecen poco trascendentes para que se observen los efectos biológicos del factor²¹. La internalización del receptor, por tanto, conduce a su destrucción²¹. Debido a que el proceso de internalización y degradación receptosómica se lleva a cabo a los 30 minutos de interaccionar el EGF con su receptor y en cambio el tiempo necesario para la completa transducción de la señal es de 8 h, parece claro que la célula debería estar ocupada en sintetizar rápidamente nuevos EGFR, para evitar la depleción de los mismos en la superficie de la membrana. Esto último no queda claro para todos los tipos de células estudiadas, aunque es avalado por algunos estudios²².

Transducción de la señal

El EGFR es una potente proteincinasa que puede autofosforilarse sobre algunos residuos de tirosina y, a la vez, puede ser fosforilada en varios residuos de serina y treonina a través de la proteincinasa C. Uno de los eventos más precoces tras la unión del EGF a su

receptor es el aumento en la fosforilación de determinadas proteínas reguladoras clave intracelulares, entre las que destacan varias fosfolipasas²³, proteincinasas y fosfatasas²⁴. En concreto se conoce que la fosforilación de la fosfolipasa C-II ocasiona la activación de la proteincinasa C, que a su vez activa la vía del inositol fosfato²³. La respuesta mitogénica del EGF parece no implicar a nucleótidos cíclicos ni a proteínas G, aunque existe alguna evidencia que sugiere que el EGF podría inducir la diferenciación de las células de la granulosa por un mecanismo en el que está implicado el adenosín-monofosfato cíclico (AMPc). Esto ha sido argumentado por algunos autores que presuponen que no todo el EGF internalizado es tan rápidamente degradado. Entre ellos se encuentran los que postulan una interacción directa del EGF con la cromatina²⁵.

Fisiología y fisiopatología celular

Las acciones del EGF en relación a la fisiología celular han sido estudiadas a fondo desde finales de la década de 1970 hasta la actualidad utilizando líneas celulares cultivadas. Su acción es mitogénica en la gran mayoría de casos^{2,16,26}, aunque se ha observado que en ciertas líneas celulares, como es el caso de las líneas hormonoindependientes de cáncer de mama, puede no tener ningún efecto, o incluso actuar inhibiendo los cultivos²⁷⁻²⁹. La falta de estimulación del EGF sobre estas y otras células parece correlacionarse inversamente con el número de EGFR que expresan en su membrana, que a su vez, en el caso de las líneas mamarias, se correlaciona con la facultad de poder prescindir de estrógenos y experimentar un crecimiento autónomo incontrolado²⁹⁻³¹.

Muchas líneas celulares son capaces de secretar al medio EGF y/o TGF- α que puede cuantificarse por el método del radioreceptor³² e incluso utilizando inmunoanálisis³¹. Los cultivos celulares permiten estudiar la expresión del EGF o de su homólogo TGF- α tanto a nivel trascricional³³ como a nivel proteico³¹, así como potenciales regulaciones a nivel postranscripcional³¹. Tales expresiones pueden analizarse en relación al crecimiento y proliferación de las células, al comprobar cómo se desarrollan los cultivos cuando se añade el EGF exógeno²⁷⁻³³. Los estudios con cultivos celulares permiten ver también que el EGF puede interaccionar con otros factores de crecimiento, modificando, por ejemplo, el número de receptores para otros factores o la propia síntesis de otros factores de crecimiento²⁷⁻³³.

Finalmente, una de las aplicaciones más importantes del cultivo celular a la farmacología experimental es comprobar cómo determinados fármacos pueden modificar la respuesta celular al EGF³⁴, así como para conocer el rol de este factor en cada uno de los órganos y sistemas de nuestro organismo³⁵. En la figura 1 se ilustra el receptor de EGF, sus ligandos y algunas de las principales moléculas implicadas en la señalización intracelular del factor.

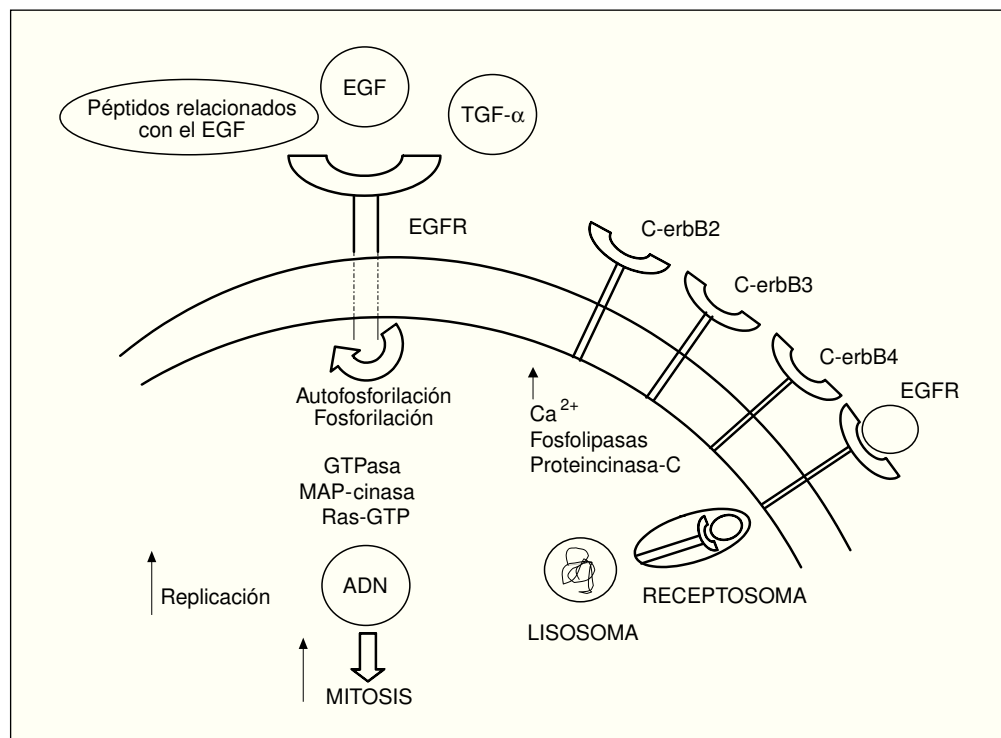


Fig. 1. Receptor del EGF (EGFR), ligandos y fisiología celular: algunos procesos clave.

FISIOLOGÍA Y FISIOPATOLOGÍA DE ÓRGANOS Y SISTEMAS. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL. ENSAYOS CLÍNICOS EN HUMANOS. IMPLICACIONES CLÍNICAS Y TERAPÉUTICAS DEL EGF

Tradicionalmente se ha considerado que EGF y TGF- α tienen acciones comunes, pero que mientras el EGF cobra especial protagonismo en el organismo adulto, el TGF- α parecía sustituir al EGF en sus funciones en aquellas células de rápida división, especialmente durante la época embrionaria y en los tumores malignos³⁶. En estos momentos caben muchos interrogantes sobre esta clásica creencia, pues sabemos que el EGF se expresa y tiene importantes funciones en las células cancerosas y durante el desarrollo embrionario^{37,38}. Cada vez tenemos más evidencias que relacionan al EGF con la formación de importantes estructuras tanto del embrión como del feto. Como muestra, un estudio muy reciente ha comprobado, por métodos inmunohistoquímicos, que no sólo el EGFR es necesario para la formación glandular en la piel del feto, sino que el EGF, y no el TGF- α , es imprescindible para tal desarrollo³⁸.

A nivel sistémico, el EGF es un mitógeno para una gran diversidad de células integradas en tejidos de origen ectodérmico y mesodérmico, como queratinocitos, células musculares lisas de los vasos sanguíneos, condrocitos, hepatocitos, células foliculares del tiroides, células de la granulosa, diferentes estirpes celulares de tejido mamario, glándulas lacrimales, glándulas de Brunner, megacariocitos y otras, así como en la

mayoría de fluidos biológicos (plasma, saliva y orina)^{2,21,35}. Interviene en numerosos procesos fisiológicos con clara relación causa efecto. El propio descubrimiento de la molécula fue a consecuencia de una de sus importantes relaciones de causalidad: en el ratón recién nacido el EGF provoca una apertura precoz de los párpados y una erupción también precoz de los dientes. En rata y en conejo estimula la maduración fetal del pulmón, la maduración hepática, la maduración pancreática y la maduración de todo el tracto gastrointestinal, promueve el crecimiento de la glándula tiroides y de las glándulas suprarrenales, facilita la liberación de GH, PRL y ACTH hipofisarias, inhibe la secreción ácida gástrica y estimula la secreción de lactógeno placentario, entre otras varias acciones claramente definidas³⁵.

El riñón, después de las glándulas salivares, es el órgano que expresa en mayor proporción este factor. En mamíferos se ha detectado un gran número de EGFR en la membrana basolateral del túbulo proximal y del túbulo colector, y en menor medida en los túbulos distales y en el glomérulo³⁹. En nefrología se ha visto que el EGF es el factor de crecimiento más efectivo para la regeneración del epitelio tubular tras una situación de necrosis tubular aguda. Las estrategias actuales y futuras para acelerar la recuperación del epitelio y para restablecer la funcionalidad de la nefrona, deben orientarse sin olvidar los mecanismos biológicos de este factor. En un modelo de insuficiencia renal aguda experimental en que se utilizó cisplatino se ha comprobado una disminución de la actividad transcripcional del pro-EGF a nivel de las células del túbulo con-

torneado distal y del asa de Henle, sin que se afectara la expresión del profactor en las glándulas salivares. Otro estudio ha comprobado esto mismo, pero en cambio los EGFR se incrementan de forma importante³⁹⁻⁴¹. La realidad es que el factor resulta ser un potente mitógeno para el túbulo proximal, que es justamente el más dañado en la necrosis tubular, ya sea tóxica o isquémica, tal como se ha comprobado en distintos modelos de nefrotoxicidad experimental. En rata, la administración farmacológica del EGF acelera de modo importante la recuperación del epitelio tubular, tanto por infusión intrarrenal como por una simple inyección subcutánea³⁹⁻⁴¹. Un interesante trabajo indica que el tratamiento sistémico con EGF acelera el proceso de recuperación tras nefrotoxicidad por bicloruro de mercurio⁴².

En gastroenterología parece que ciertos agentes antiulcerosos, como la sulglicotida, incrementan el número de receptores de EGF en la mucosa gástrica³⁴. Resultados obtenidos de estudios fisiológicos y farmacológicos indican que el EGF debe estar implicado en la patogenia de muy diversas enfermedades entéricas y que podría actuar de intermediario en el mecanismo de acción de algunos fármacos. Parece que el EGF estimula la emigración de células epiteliales hacia aquellas zonas donde existe lesión, promoviendo la regeneración del nuevo epitelio. La actividad farmacológica del EGF ya ha sido estudiada en terapéutica clínica para el tratamiento de la enterocolitis necrotizante, el síndrome de Zollinger-Ellison, la úlcera gastroduodenal y la atrofia congénita de las microvellosidades intestinales. Se han realizado ensayos clínicos controlados para evaluar la eficacia y la seguridad de la administración de EGF por vía endovenosa para el tratamiento de la úlcera gástrica que demuestran una sensible diferencia entre la tasa de cicatrización obtenida en pacientes tratados respecto a los que recibieron placebo⁴³.

En hematología, pacientes con leucemia promielocítica aguda presentan un incremento de la excreción de EGF en orina de 24 h, y dicha secreción se normaliza tras remisión del episodio agudo, sin que se conozcan todavía las potenciales implicaciones terapéuticas del factor sobre esta y muchas otras enfermedades hematológicas⁴⁴. En muchas enfermedades hematológicas, especialmente de tipo oncológico, la investigación del EGF debe todavía aportar mucha información, en especial en relación a la patogenia y a la terapéutica⁴⁴.

En odontología se ha comprobado, en explantes de encía humana, que el EGF desempeña un papel fundamental en el proceso de gingivitis, a través de mediadores inflamatorios, sobre todo la bradisinina, así como en el proceso antiinflamatorio⁴⁵.

El estudio del efecto tópico del EGF sobre la reparación tisular en casos de quemaduras y heridas constituye uno de los campos más atractivos referidos a la utilización terapéutica del factor, por la posibilidad de aplicar la molécula a modo de fármaco a nivel local^{46,47}. Franklin y Lynch⁴⁸ fueron pioneros

en estudiar las propiedades terapéuticas del EGF aplicado sobre heridas de espesor total en orejas de conejo, comprobando que aplicaciones repetidas aceleraban el cierre. La inyección de EGF en tejido celular subcutáneo de rata parece revertir la inhibición inducida con corticoides sobre la formación de tejido de granulación⁴⁹. Falanga et al estudian la eficacia del EGF en pacientes con úlceras venosas mediante ensayos clínicos controlados y a doble ciego, sin demostrarse mejoría del curso clínico pero con buenos resultados en cuanto a cicatrización de las heridas^{50,51}.

Un grupo japonés ha constatado, en rata, que cuando el EGF se aplica sobre heridas abiertas, junto a un tratamiento simultáneo con inhibidores de las proteasas séricas, se incrementa notablemente el tejido de granulación sobre las mismas. La concentración tópica de EGF exógeno que suele aplicarse en los estudios experimentales oscila entre 10 y 1.000 mg/ml, muy superiores a las necesarias para estimular el crecimiento celular *in vitro*, sin que se conozcan bien posibles causas de pérdida de bioactividad, salvo la muy pobre implicación de las proteasas^{51,52}.

Recientemente, un grupo mexicano ha aplicado EGF recombinante sobre el pie diabético en dos pacientes con neuropatía diabética que presentaban úlceras de presión; las úlceras evolucionaron favorablemente⁵², por lo que se propone estudiar a fondo la utilidad del EGF para esta indicación. Las propiedades tópicas del EGF sobre procesos ulcerosos, heridas y quemaduras debe continuar investigándose mediante ensayos clínicos controlados, estratificando las indicaciones (heridas, quemaduras, úlceras...), las características de las lesiones y la etiopatogenia de las mismas. Futuros estudios deben analizar un número suficiente de pacientes y valorar el coste-beneficio del tratamiento. Los datos que se tienen hasta el momento parecen indicar que puede ser útil sobre algunas de estas lesiones, pero el análisis de los trabajos existentes indica que no existe todavía suficiente evidencia científica como para emplear el factor de modo rutinario en ninguno de estos procesos. Probablemente los geles que contengan EGF junto a otros factores de crecimiento podrán ser comercializadas con éxito en un futuro^{51,52}.

La administración sistémica de la molécula se encuentra limitada por los importantes efectos secundarios demostrados. La potente estimulación que produce sobre el crecimiento celular⁴³, junto a la vasoconstricción renovascular⁵³ y la resorción ósea⁵⁴, constituyen importantes limitaciones para su aplicación sistémica.

La figura 2 pretende resaltar la amplia diversidad de efectos biológicos del factor implicándolo en campos muy diferentes de la medicina. Futuros mecanismos selectivos para dirigir los efectos de la molécula hacia células específicas se vislumbran como una futura terapia para combatir muchas enfermedades, pero sobre todo los procesos cancerosos. En el próximo apartado nos centramos en este último aspecto.

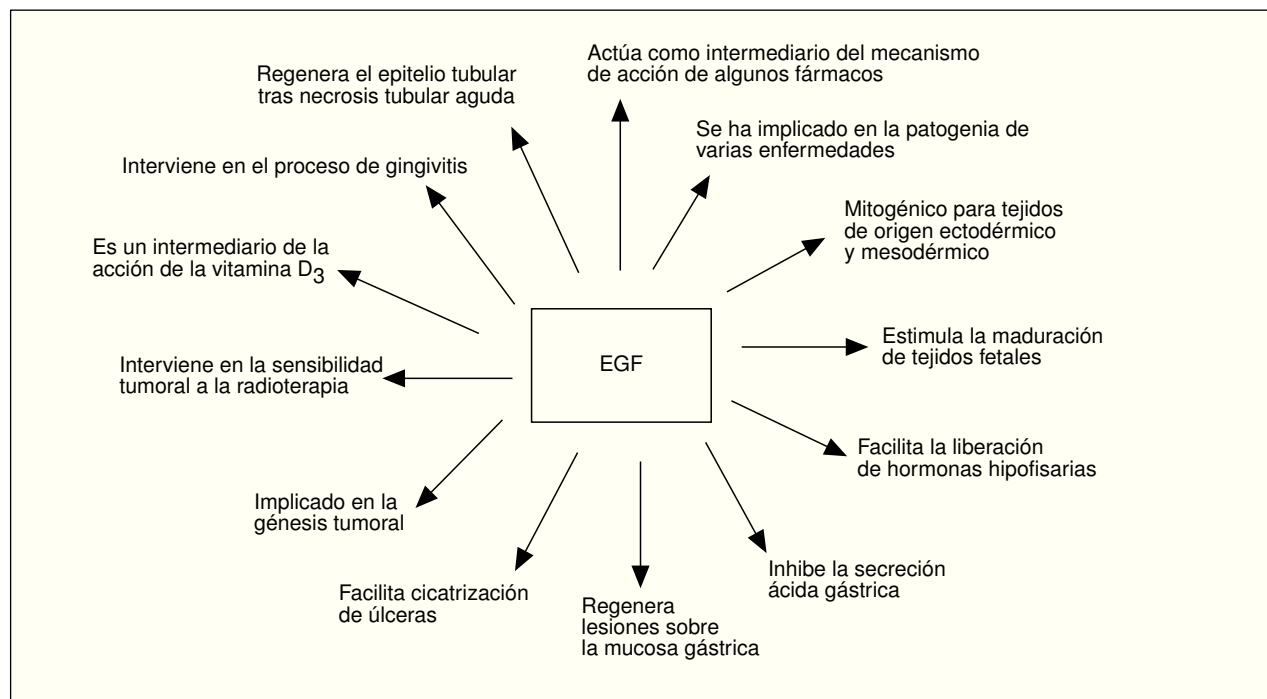


Fig. 2. Algunos ejemplos de la diversidad de efectos y aplicaciones del EGF en medicina.

ONCOLOGÍA MOLECULAR Y CLÍNICA DEL EGF

La importancia del EGF en el campo de la oncología molecular, y cada vez más en oncología clínica, se refleja en el incontable número de trabajos que lo implican, tal como puede comprobarse a través del análisis de la bibliografía oncológica aparecida en los últimos treinta años. Aquí nos limitamos a destacar algunos de los aspectos más relevantes, junto a otros muy novedosos, con la pretensión de relacionar al factor con los diferentes niveles de estudio del cáncer.

En la mayoría de cánceres humanos se han detectado alteraciones en la expresión del factor, de su receptor de membrana, de las vías de señalización intracelular y de los genes relacionados tanto con el factor como con su receptor. Existen estudios que utilizan cultivos celulares de líneas cancerosas obtenidas de la práctica totalidad de tumores humanos malignos. En estas líneas se ha estudiado especialmente la relación entre la expresión del EGFR y la dependencia hormonal del tumor, el efecto farmacológico de hormonas, de fármacos y de otros factores de crecimiento, etc. Los resultados de estos estudios han facilitado la comprensión de la función del EGF sobre la célula cancerosa y han aportado al estudio de biopsias tumorales evidencias pronósticas y orientaciones referidas al abordaje terapéutico.

Las investigaciones en este campo relacionan el EGF con otras muchas moléculas, no sólo relaciona-

das con las propias células tumorales, sino también con las células del estroma que pueden actuar de modo paracrino^{26-36,55-58}. Los fármacos anticancerosos son evaluados primariamente en líneas celulares, que permiten comprobar la potencia del efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular y escoger los más adecuados para ser ensayados en animales. Recientes trabajos continúan comprobando cada vez más las implicaciones de este factor sobre el efecto de otras moléculas. Cabe destacar, por ejemplo, el reciente descubrimiento del mecanismo inhibitorio de la vitamina D. Hace tiempo que se conocen las propiedades inhibitorias sobre la proliferación celular de la 1,25-dihidroxi-vitamina D₃. Se acaba de descubrir que este efecto parece ser consecuencia de las modificaciones que esta vitamina provoca sobre el EGF y sobre las vías de señalización relacionadas con el EGF⁵⁹.

La investigación del EGF en el proceso oncogénico tiene un futuro prometedor, ya que su repercusión sobre el eje p53-p21-ciclina-cdks todavía se encuentra poco investigada^{60,61}. Si los factores de crecimiento son claves en la regulación del crecimiento y proliferación de las células, obligatoriamente todos ellos deben, de algún modo, modificar en último término la actividad de las proteincinasas dependientes de ciclinas (cdks). En este sentido, a pesar de los muchos factores de crecimiento que se conocen, la cantidad de trabajos referidos al TGF- β es desproporcionada respecto a todos los demás. En el fondo esto supone una cierta ventaja, porque la mucha información acumula-

da relativa al TGF- β , y especialmente a su isoforma TGF- β 1, supone, junto a lo que sabemos sobre el EGF, uno de los pilares más importantes en los que se basa la fisiología celular moderna, y facilitará una mejor comprensión de las modificaciones intracelulares que en un futuro puedan observarse para otros factores de crecimiento.

En relación a las cdk, el EGF ha sido mucho menos estudiado, pues clásicamente se ha considerado que la principal vía de señalización intracelular es la de la MAP-cinasa (o proteincinasa activada por mitógenos). Decíamos que cuando la MAP-cinasa se encuentra activada, fosforila algunas proteínas reguladoras de genes, facilitándose la transcripción de los mismos. Actualmente se cree que el EGF y otros factores mitogénicos tienen también acciones directas sobre la actividad de las cdk, al menos con la cdk que depende de la ciclina D1 y que resulta necesaria para el avance de la fase G1 a la fase S⁶¹. En este sentido, parece que el EGF facilita la transcripción de la ciclina D1 y, por tanto, la actividad de la cdk relacionada^{60,61}.

El estudio del EGF/EGFR en muestras tumorales parece tener cada vez más importancia en el manejo clínico del paciente⁶²⁻⁶⁶, sobre todo para el cáncer de mama, donde la expresión del EGFR en biopsias constituye un factor pronóstico⁶⁵. Desde nuestro laboratorio ya indicamos la utilidad clínica de medir este receptor, así como la necesidad de normalizar el procedimiento para cuantificarlo⁶⁶. Hasta el momento la cuantificación del propio EGF no ha trascendido a la práctica clínica, pero la posibilidad de determinar concentraciones tanto en muestras sanguíneas como en saliva constituye un método incruento que podría ser útil, al menos para el cáncer de mama⁶⁴. Un trabajo reciente implica al EGFR en la evolución del cáncer gástrico⁶³. Según estos investigadores, el EGFR es un predictor independiente de peor pronóstico en este cáncer, y los tumores más avanzados muestran un mayor número de EGFR medidos por la técnica del radioreceptor.

En general, los tumores que hiperexpresan el EGFR muestran *in vivo* una menor respuesta a la radioterapia y menor apoptosis radioinducida. Parece ser que la irradiación del tumor activa las vías de señalización intracelular, en particular la MAP-cinasa, a través del EGFR. Tal activación parece ocurrir antes del primer minuto de aplicar una radiación ionizante de entre 0,5-5 Gy, en función del tipo de tumor. Los eventos intracelulares inmediatos parecen ser la activación de la fosfolipasa C, un incremento en la expresión de IP3 y el aumento del calcio intracelular; en definitiva, tres fenómenos cruciales para la activación de la MAP-cinasa⁶⁷. La rapidez de estas respuestas hace que algunos estudiosos del tema consideren al EGFR como un sensor biológico del efecto radiactivo⁶⁸. Parece que las radiaciones ionizantes incrementan la expresión de TGF- α , que se une al EGFR, y simultáneamente disminuyen el efecto inhibidor del TGF- β , con lo cual

ciertas células irradiadas podrían incluso acelerar su división. Diversos experimentos tratan de bloquear el EGFR y/o sus vías de señalización para comprobar un mayor beneficio de la radioterapia. El bloqueo de los receptores HER-1 y HER-2, estructuralmente homólogos al EGFR, constituye una de las líneas de investigación más actuales en este campo⁶⁷⁻⁶⁹.

FACTORES DE CRECIMIENTO, EGF Y FUTURO

Entre las claves para vencer el cáncer destaca la intervención inmunofarmacológica dirigida selectivamente hacia la célula cancerosa. La posibilidad de encontrar fármacos que actúen sobre el EGF, el EGFR o algún intermediario implicado en su señalización constituye una esperanza real de futuro para combatirlo. En este sentido, el ensayo de anticuerpos monoclonales (de ratón y humanos) contra el EGFR es una dedicación absoluta por parte de ciertos laboratorios en todo el mundo. Ciertamente, estudios preclínicos realizados en la pasada década proporcionaron resultados sorprendentes. En cultivos celulares de líneas tumorales de cáncer de mama, páncreas, colon, próstata y otros muchos se ha comprobado que anticuerpos monoclonales de ratón anti-EGFR inhiben el crecimiento celular e inducen apoptosis^{70,71}. Más interesante aún resulta la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* en animales de experimentación⁷⁰⁻⁷².

A pesar de las dificultades que, dado el pleiotropismo del EGFR, entrañan los ensayos clínicos de estos anticuerpos en humanos, las primeras evidencias de eficacia y toxicidad en animales propiciaron una rápida aparición de ensayos clínicos en fase I sobre enfermos desahuciados, con la expectativa de obtener mejoras sustanciales en el curso clínico. En pacientes terminales con cáncer de pulmón se han empleado anticuerpos monoclonales de ratón contra el EGFR humano, pero en menos de dos semanas los pacientes crean anticuerpos altamente inmunogénicos contra los anticuerpos de ratón. Desde entonces no ha cesado de investigarse cómo disminuir la inmunogenicidad de estos anticuerpos y cómo dirigirlos con mayor especificidad hacia la célula tumoral. El éxito de esta terapia, tal como indican ensayos clínicos en fase III que actúan sobre el EGFR, pasa por la enorme dificultad en encontrar antígenos selectivos de las células tumorales y por el modo de dirigir los anticuerpos monoclonales únicamente hacia las células cancerosas.

Los resultados de los ensayos clínicos en humanos utilizando anticuerpos anti-EGFR son de incalculable valor, por los éxitos obtenidos por las expectativas puestas sobre este tipo de terapia, aplicada tanto a otros antígenos relacionados con el EGF como con otras moléculas que hiperexpresan las células tumorales⁷⁰⁻⁷³. Prácticamente todos los meses aparecen en la bibliografía algunos artículos que implican al EGF en nuevos quimioterápicos. Entre los más recientes desta-

ca un estudio que parece indicar que, si se bloquea el EGFR tanto con quercetina como con luteolina, se obtiene una inhibición de la proliferación celular y apoptosis sobre células tumorales pancreáticas⁷⁴. Brunelleschi et al revisan un conjunto de fármacos de reciente aparición capaces de inhibir el fisiologismo del EGFR y de otros receptores tirosincinasa, ya evaluados en fase preclínica e incluidos en estos momentos en ensayos clínicos⁷⁵.

En una revisión tan general como ésta resulta muy difícil incluir lo mucho que se sabe del EGF en todos los apartados seleccionados. De cada uno de ellos se podría hacer una o incluso varias extensas revisiones, algunas excelentes y de gran actualidad^{76,77}. La única pretensión ha sido sintetizar el significado fisiológico, patológico y clínico de la molécula y referenciar una serie de trabajos que denotan su gran actividad biológica y sus aplicaciones prácticas en la realidad clínica, y que prevén que continuará siendo uno de los factores de crecimiento más importantes en la investigación fisiológica, endocrinológica, patológica, oncológica y terapéutica del futuro próximo. Han pasado justamente cuarenta años desde el descubrimiento del factor, y es seguro que, dentro de cuarenta años más, enfermedades todavía hoy mortales se curarán gracias a los resultados de próximas investigaciones sobre esta molécula, cuya actividad biológica es una de las más potentes que se conocen.

BIBLIOGRAFÍA

- Cohen S. Isolation of a submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J Biol Chem* 1962;237:1555-62.
- Martínez-Carpio PA. Secreción constitutiva y regulada del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y del factor transformante del crecimiento- β 1 (TGF- β 1) en cultivos de la línea celular MDA-MB-231 [tesis doctoral]. Barcelona: Publicaciones Universidad de Barcelona, 1999.
- Brissenden JE, Ullrich A, Francke U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* 1984;310:781-4.
- Rall LB, Scott J, Bell GL, Crawford RJ, Penschow JD, Niall HD, et al. Mouse pre-pro-epidermal growth factor synthesis by the kidney and other tissues. *Nature* 1985;313:228-31.
- Hirata Y, Moore GW, Bertagna C, Orth DN. Plasma concentrations of immunoreactive human epidermal growth factor (urogastrone) in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;50:440-4.
- Massagué J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Ann Rev Biochem* 1993;62:515-41.
- Davis CG. The many faces of epidermal growth factor repeats. *New Biologist* 1990;2:410-9.
- Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocrine Rev* 1990;11:418-42.
- Pandiella A, Massagué J. Cleavage of the membrane precursor for transforming growth factor- α is a regulated process. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:1726-30.
- Bringman TS, Lindquist PB, Derynck R. Different transforming growth factor- α species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell* 1987;48:429-40.
- Pandiella A, Massagué J. Multiple signals activate cleavage of the membrane transforming growth factor- α precursor. *J Biol Chem* 1991;266:5769-73.
- Basenberger MW, Pandiella A, Massagué J. Activated release of membrane-anchored TGF- α in the absence of cytosol. *J Cell Biol* 1993;122:95-101.
- Linsey PS, Hargreaves WR, Twardzik DR, Todaro GJ. Detection of larger polypeptides structurally and functionally related to type I transforming growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:356-60.
- Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, et al. Structure of mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 1983;221:238-40.
- Prigent SA, Lemoine NR. Type I (EGF-related) family of growth factor receptors and their ligands. *Prog Growth Factor Res* 1992;4:1-24.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. 3.^a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1996.
- Chen WS, Lazar CS, Lund KA, Welsh JB, Chang C, Walton GM, et al. Functional independence of the epidermal growth factor receptor from a domain required for ligand-induced internalization and calcium regulation. *Cell* 1989;59:33-43.
- Rajkumar T, Gullick WJ. The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:3-9.
- Carpenter G, Cohen S. ¹²⁵I-labelled human epidermal growth factor (h-EGF): binding, internalization and degradation in human fibroblast. *J Cell Biol* 1976;71:159-71.
- Savion N, Vlodavsky I, Gospodarowicz D. Role of the degradation process in the mitogenic effect of epidermal growth factor. *Proc Nat Acad Sci USA* 1980;77:1466-70.
- Carpenter G. Epidermal growth factor: biology and receptor mechanism. *J Cell Sci* 1985;3:1-9.
- Stoscheck CM, Soderquist AM, Carpenter G. Byosynthesis of the epidermal growth factor receptor in cultured human cells. *Endocrinology* 1985;116:528-35.
- Margolis B, Rhee SG, Felder S, Mervic M, Lyall R, Levitzki A, et al. EGF induces phosphorylation of phospholipase C-II: a potential mechanism for EGF receptor signalling. *Cell* 1989;57:1101-7.
- Yang SD, Chou CK, Huang S, Song JS, Chen HC. Epidermal growth factor induces activation of protein kinase FA and ATP Mg-dependent protein phosphatase in A431 cells. *J Biol Chem* 1989;264:5407-11.
- Rakowicz-Szulczyska EM, Otwiaska D, Rodeck U, Koprowski H. Epidermal growth factor (EGF) and monoclonal antibody to cell surface EGF receptor bind to the same chromatin receptor. *Arch Biochem Biophys* 1989;268:456-64.
- Osborne K, Hamilton B, Titus G, Livingstone RB. Epidermal growth factor stimulation on human breast cancer cells in culture. *Cancer Res* 1980;40:2361-6.
- Armstrong DK, Kaufmann SH, Ottaviano YL, Furuya Y, Buckley JA, Isaacs JT, et al. Epidermal growth factor-mediated apoptosis of MDA-MB-468 human breast cancer cells. *Cancer Res* 1994;54:5280-3.
- Kaplan O, Jaroszewski JW, Faustino PJ, Zugmaier G, Ennis BW, Lippman M, et al. Toxicity and effects of epidermal growth factor on glucose metabolism of MDA-468 human breast cancer cells. *J Biol Chem* 1990;265:13641-9.
- Mur C, Martínez-Carpio PA, Fernández-Montolí ME, Ramón JM, Rosel P, Navarro MA. Growth of MDA-MB-231 cell line: different effects of TGF- β 1, EGF and estradiol depending on the length of exposure. *Cell Biol Int* 1998;22:679-84.
- Martínez-Carpio PA, Mur C, Rosel P, Navarro MA. Secretion and dual regulation between epidermal growth factor and transforming growth factor- β 1 in MDA-MB-231 cell line in 42-hour-long cultures. *Cancer Lett* 1999;147:25-9.

31. Martínez-Carpio PA, Mur C, Rosel P, Navarro MA. Constitutive and regulated secretion of Epidermal Growth Factor and Transforming Growth Factor- β 1 in MDA-MB-231 cell line in 11-day cultures. *Cell Signal* 1999;11:753-7.
32. Dickson RB, Bates SE, McManaway ME, Lippman ME. Characterization of estrogen responsive transforming activity in human breast cancer cell lines. *Cancer Res* 1986;46:1707-13.
33. Zajchowski D, Band V, Pauzie Nelly, Tager A, Stampfer M, Sager R. Expression of growth factors and oncogenes in normal and tumor-derived human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1988;48:7041-7.
34. Piotrowski J, Majka J, Sano S, Nowak P, Murty VL, Slomiany A, et al. Enhancement in gastric mucosal EGF and PDGF receptor expression with ulcer healing by sulglycotide. *Gen Pharmacol* 1995;26:749-53.
35. Fisher DA, Lakshmanan J. Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocrine Rev* 1990;11:418-42.
36. Han VKM, Hunter ES, Pratt RM, Zenguei JC, Lee DC. Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua. *Mol Cell Biol* 1987;7:2335-43.
37. Miettinen PJ, Chin JR, Shum L, Slavkin HC, Shuler CF, Derynck R, et al. EGF receptor function is necessary for normal craniofacial development and palate closure. *Nature Genetics* 1999;22:69-73.
38. Li J, Fu X, Sun X, Sun T, Sheng Z. The interaction between epidermal growth factor and matrix metalloproteinases induces the development of sweat glands in human fetal skin. *J Surg Res* 2002;106:258.
39. Fisher DA, Salido EC, Barajas L. Epidermal growth factor and kidney. *Annu Rev Physiol* 1989;51:67-80.
40. Humes HD, Cieslinski DA, Colimbra TM, Messana JM, Galvao C. Epidermal growth factor enhances renal tubular cell regeneration and repair and accelerates the recovery of renal function in postischemic acute renal failure. *J Clin Invest* 1989;84:1757-61.
41. Norman J, Tsau YW, Bacay A, Fine L. Epidermal growth factor accelerates functional recovery from ischaemic acute tubular necrosis in the rat: role of the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest* 1989;84:1757-61.
42. Coimbra TM, Cielinski DA, Humes HD. Epidermal growth factor accelerates renal repair in mercuric chloride nephrotoxicity. *Am J Physiol* 1990;259:438-43.
43. Guglietta A, Sullivan PB. Clinical applications of epidermal growth factor. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:945-50.
44. Wu X, Qureshi IA, Liu H, Yin J, Quian X, Ruijie X. Epidermal growth factor in acute promyelocytic leukemia treated with retinoic acid. *Int J Hematol* 1995;62: 83-9.
45. McAllister B, Leeb-Lundberg F, Melloning J, Olson M. The functional interaction of EGF and PDGF with bradykinin in the proliferation of human gingival fibroblasts. *J Periodontol* 1995;66:429.
46. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Michell RO, Pietsdc J, Nordquist R, et al. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann Surg* 1988;208:788-94.
47. Thornton JW, Hess CA, Cassingham V, Bartler RH. Epidermal growth factor in the healing of second degree burns: a controlled animal study. *Burns Incl Therm Inj* 1982;8:156-60.
48. Franklin JD, Lynch B. Effects of topical applications of epidermal growth factor on wound healing. Experimental study in rabbit ears. *Reconstr Surg* 1979;339:213-4.
49. Okumura K, Kiyohara Y, Komada F, Iwakawa S, Hirai M, Fuwa T. Improvement in wound healing by epidermal Growth Factor (EGF) ointment. Effect of nafamostat, gababexate, or gelatin on stabilization and efficacy of EGF. *Pharm Res* 1990;7:1289-93.
50. Falanga V, Eaglstein WH, Bucalo B, Katz MH, Harris B, Carson P. Topical use of recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers. *J Dermatol Surg Oncol* 1992;18:604-6.
51. Falanga V. Overview of chronic wounds and recent advances. *Dermatol Ther* 1999;9:7-17.
52. Escotto I, Rodríguez Trejo JM, Padilla L, Rodríguez Ramírez N. Factores de crecimiento en el tratamiento de úlceras en pacientes diabéticos. Mitos y realidades. *Rev Mex Angiología* 2001;29:75-82.
53. Harris RC, Hoover RL, Jacobson HR, Badr KF. Evidence for glomerular actives of epidermal growth factor in the rat. *J Clin Invest* 1988;82:1028-39.
54. Marie PJ, Hott M, Perheentupa J. Effects of EGF on bone formation and resorption in vivo. *Am J Physiol* 1990;258:275-81.
55. Coffey RJ, Sipes NJ, Bascom CC, Graves-Deal R, Pennington CY, Weissman BE, et al. Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. *Cancer Res* 1988;48:1596-602.
56. Tsao MS, Zhang XY, Liu C, Grisham JW. Regulation by epidermal growth factor of the expression of transforming growth factor- β 1 mRNA in cultured rat liver epithelial cells. *Exp Cell Res* 1991;195:214-7.
57. Tait DL, MacDonald PC, Casey ML. Parathyroid hormone-related protein expression in gynecic squamous carcinoma cells. *Cancer* 1994;73:1515-21.
58. Holting T, Duh OY, Clark OH, Herfarth C. Wachstum und invasion beim differenzierten schilddrusencarcinom. *Chirurg* 1994;65:1100-6.
59. Cordero JB, Cozzolino M, Lu Y, Vidal M, Slatopolsky E, Stahl PD, et al. 1,25-dihydroxy vitamin D downregulates cell membrane and nuclear-growth promoting signals by the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2002;277: 38965-71.
60. Martínez-Carpio PA, Navarro MA. Factores de crecimiento celular, daño celular, proteína-quinasas dependientes de ciclinas y sus inhibidores: su relevancia en la patología molecular del cáncer humano. *Med Clin (Barc)* 2003;120:265-71.
61. Saikawa Y, Kubota T, Otani Y, Kitajima M, Modlin IM. Cyclin D1 antisense oligonucleotide inhibits cell growth stimulated by epidermal growth factor and induces apoptosis of gastric cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:1102-9.
62. Sheikh MS, Shao ZM, Chen JC, Li XS, Hussain A, Fontana JA. Expression of estrogen receptors in estrogen receptor-negative human breast carcinoma cells: modulation of epidermal growth factor-receptor and transforming growth factor α gene expression. *J Cell Biochem* 1994;54:289-98.
63. Kopp R, Ruge M, Rothbauer E, Cramer C, Kraemling HJ, Wiebeck B, et al. Impact of EGF radioreceptor analysis on long-term survival of gastric cancer patients. *Anticancer Res* 2002;22:1161-7.
64. Navarro MA, Mesía R, Díez-Gibert O, Rueda A, Ojeda B, Alonso MC. Epidermal growth factor in plasma and saliva of patients with active breast cancer and breast cancer patients in follow-up compared with healthy women. *Breast Cancer Res Treat* 1997;42:83-6.
65. Klijn JG, Berns PMJ, Schmitz PI, Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. *Endocrine Rev* 1992;13:7.
66. Díez-Gibert O, Fernández-Montolí ME, Nàcher V, Navarro MA. Estimation of the epidermal growth factor receptor by the hydroxyapatite method in human breast cancer. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1995;33:563-8.
67. Ruifrok ACC, McBride WH. Growth factors: biological and clinical aspects. *Int J Radiation Oncology Biol Phys* 1999;43: 877-81.
68. Schmidt-Ullrich RK, Mikkelsen RB, Dent P, Todd DG, Valerie K, Kavanagh BD, et al. Radiation-induced proliferation of the human A431 squamous carcinoma cells is dependent on EGFR tyrosine phosphorylation. *Oncogene* 1997;15:1191-7.

Martínez-Carpio PA. El factor de crecimiento epidérmico cuarenta años después de su descubrimiento: de la bioquímica a la clínica

69. Dinney CPN, Parker C, Dong Z, Fan D, Eve BY, Bucana C, et al. Therapy of human transitional cell carcinoma of the bladder by oral administration of the epidermal growth factor receptor protein tyrosinekinase inhibitor, 4,5-dianilinophthalimide. *Clin Cancer Res* 1997;3:161-8.
70. Modjtahedi H, Dean C. The receptor for EGF and its ligands: expression, prognostic value and target for therapy in cancer. *Int J Oncol* 1994;4:277-96.
71. Modjtahedi H, Komurasaki T, Toyoda H, Dean C. Anti-EGFR monoclonal antibodies which act as EGF, TGFA, HB-EGF and BTC antagonists block the binding of epiregulin to the EGFR expressing tumors. *Int J Cancer* 1998;75:310-6.
72. Stragliotto G, Vega F, Stasiecki P. Multiple infusions of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody (EMD 55900) in patients with recurrent malignant gliomas. *Eur J Cancer* 1996;32:636-46.
73. Mendelsohn J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 1997;3:2703-7.
74. Lee LT, Huang YT, Hwang JJ, Lee PP, Ke FC, Nair MP, et al. Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Res* 2002;22:1615-27.
75. Brunelleschi S, Penego L, Santoro MM, Gaudino G. Receptor tyrosine kinases as target for anticancer therapy. *Curr Pharm Des* 2002;8:1959-72.
76. Baselga J. Targeting the epidermal growth factor receptor: a clinical reality. *J Clin Oncol* 2001;19:41-4.
77. Yarden Y, Sliwkowsky MX. Untangling the Erb B signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:127-37.